Vergleichende Untersuchungen des Hautoberflächenfettes Gesunder und Aknekranker

Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Pharmazie

der

Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Gerhard Brunn

aus Lahr

1971

Vergleichende Untersuchungen des Hautoberflächenfettes Gesunder und Aknekranker

Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Pharmazie

der

Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Gerhard Brunn

aus Lahr

1971

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. H. Auterhoff

1. Berichterstatter: Professor Dr. E. Graf

2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Tronnier

Tag der mündlichen Prüfung: 25. 10. 1971

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v. Spangenberg KG · Tübingen

Meiner Mutter und meiner Frau

in Dankbarkeit

Meinen verehrten Lehrern,
Herrn Professor Dr. Engelbert Graf und
Herrn Professor Dr. Hagen Tronnier,
danke ich sehr herzlich für die Überlassung
der Arbeit, für die zahlreichen Anregungen
und die mir erwiesene großzügige Unterstützung.

Herrn Professor Dr. Harry Auterhoff
danke ich herzlich für die wohlwollende
Förderung dieser Arbeit

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG 1

TEXT-TEIL

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen 7

A. Gewinnung und Isolierung des Hautoberflächenfettes 8

B. Methodik des Analysenganges 9

I. Säulenchromatographische Trennung 10

II. Dünnschichtchromatographische Prüfung des Hautfettes nach der sc Trennung 11

III. Hydrolyse der Ester zur Gewinnung der Fettsäuren 13

IV. Darstellung der Fettsäuremethylester 14

V. Gaschromatographische Trennung 15

1. Qualitative Trennung 15

2. Identifizierung und quantitative Auswertung 17

C. Analysenergebnisse der Normalhautfette 24

D. Analysenergebnisse der Aknehautfette 32

STATISTIK UND DISKUSSION DER ERGEBNISSE 40

ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE 47

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Geräte 48

A. Zur Durchführung des Analysenganges mit Modellgemischen aus Referenzsubstanzen 49

Seite

I. Abtrennung der wasserlöslichen und petrol-ätherunlöslichen Bestandteile und der freien Fettsäuren 49

II. Sc Trennung mit anschließender dc Prüfung 50

III. Gaschromatographische Trennung 53

1. Probenvorbereitung 53

2. Identifizierung 54

3. Quantitative Auswertung der GC 55

EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Über die Zusammensetzung des Hautoberflächenfettes von gesunden Personen liegen bereits einige Arbeiten vor - erste Untersuchungen stammen von C. SCHMIDT[1] aus dem Jahr 1878 -, besonders erwähnt seien hier die Veröffentlichungen des Kreises um N. NICOLAIDES[2-6], von V.R. WHEATLEY und Mitarb.[7-10], der Schule von H.P. KAUFMANN[11] und die Arbeiten von K. BEY[12].

Tabelle 1 zeigt die Zusammensetzung des Hautfettes am menschlichen Oberarm[7].

---

1) C. SCHMIDT, Lehrbuch der physiologischen Chemie von Gorup-Besanez, S. 556, Braunschweig 1878
2) R.A. BROWN, W.S. YOUNG u. N. NICOLAIDES, Analytic. Chem. 26, 1653 (1954)
3) N. NICOLAIDES, J. invest. Dermatol. 37, 507 (1961)
4) N. NICOLAIDES u. R.C. FOSTER, J. Amer. Oil Chemists' Soc. 33, 404 (1956)
5) N. NICOLAIDES u. G.C. WELLS, J. invest. Dermatol. 29, 423 (1957)
6) N. NICOLAIDES, O.K. REISS u. R.G. LANGDON, J. Amer. chem. Soc. 77, 1535 (1955)
7) V.R. WHEATLEY, Seifen - Oele - Fette - Wachse, 81, 214 (1955)
8) V.R. WHEATLEY, Biochem. J. 63, 269 (1956)
9) B. BOUGHTON u. V.R. WHEATLEY, J. invest. Dermatol. 33, 49 (1959)
10) B. BOUGHTON, R.M.B. MACKENNA, V.R. WHEATLEY u. A. WORMALL, Biochem. J. 66, 32 (1957)
11) H.P. KAUFMANN u. C.V. VISWANATHAN, Fette - Seifen - Anstrichmittel, 65, 607 (1963)
12) K. BEY, Fette - Seifen - Anstrichmittel, 65, 611 (1963) u. 66, 580 (1964)

Tabelle 1

Die Hautfettzusammensetzung am menschlichen Oberarm

freie Fettsäuren	30,0%
Triglyceride	32,5
Wachs- u. Cholesterinester	15,0
verschiedene Sterine	7,5
Squalen	5,0
Kohlenwasserstoffe	7,5
nicht identifizierter Rest	5,0

Tabelle 2

Die Analyse von Hautfettextrakten aus getragener Wäsche von je 4 männlichen (M) und weiblichen (W) Personen[12] in %.

Substanzen	M1	M2	M3	M4	W5	W6	W7	W8
wasserlösliche Bestandteile (u.a. Harnstoff u. Aminosäuren)	1,0	2,8	1,4	4,7	0,9	0,5	0,9	0,7
Petrolätherunlösl. Bestandteile (u.a. Cholesterin u. Phospholipoide)	3,8	4,8	4,8	5,1	5,3	1,9	2,2	2,2
freie Fettsäuren	15,0	14,9	25,7	19,3	15,1	8,8	17,6	16,3
Kohlenwasserstoffe	4,8	4,7	1,5	3,1	4,8	2,1	2,0	1,8
Squalen	9,7	8,8	10,2	8,1	9,6	8,3	8,9	9,2
Wachs- und Cholesterinester	17,9	20,5	17,3	20,1	15,0	20,8	17,4	19,3
Triglyceride	35,5	35,1	33,4	31,7	34,6	43,9	35,9	37,6
Mono-Diglyceride	12,6	8,1	6,1	6,6	13,8	14,0	14,9	13,7
Fettalkohole	0,5	0,2	0,2	0,2	0,6	0,2	0,4	0,3

In Tab. 2 besonders zu beachten sind die Versuchspersonen M3 mit einem hohen freien Fettsäureanteil, aber niedrigem Triglyceridgehalt und W6 mit einem niedrigen freien Fettsäureanteil, aber dafür hohen Triglyceridgehalt.

Auf diesen Zusammenhang zwischen freien Fettsäuren und Triglyceriden werden wir noch im Rahmen unserer Untersuchungen zurückkommen.

Derselben Arbeit sind auch die in Tab. 3 angegebenen Näherungswerte der gc Analyse über die Verteilung der freien und gebundenen Fettsäuren entnommen.

Tabelle 3

Komponente	freie Fettsäuren	Fettsäuren aus Triglyceriden	Fettsäuren aus Mono-Diglyceriden	Fettsäuren aus Wachsen
n-C_8	+	+	+	+
n-C_9	+	+	+	+
n-C_{10}	+	+	+	+
n-$C_{11}^{=}$	-	+	-	-
n-C_{11}	+	+	+	+
n-$C_{12}^{=}$	-	+	-	+
n-C_{12}	1,7	1,5	1,6	+
iso-C_{13}	+	+	+	+
n-$C_{13}^{=}$	-	+	-	-
n-C_{13}	+	+	+	+
n-$C_{14}^{=}$	+	2,9	2,9	8,0
n-C_{14}	10,2	6,9	10,4	5,3
iso-C_{15}	+	3,5	2,6	4,3
n-$C_{15}^{=}$	3,5	5,0	4,0	6,0
n-C_{15}	7,2	6,4	5,9	3,2
iso-C_{16}	-	-	-	+
n-$C_{16}^{=}$	14,2	19,7	15,1	40,0
n-C_{16}	28,0	21,5	23,9	11,0
iso-C_{17}	4,2	5,7	5,1	4,4
n-$C_{17}^{=}$	3,4	3,9	5,0	3,5
n-C_{17}	1,7	1,2	1,6	+
n-$C_{18}^{==}$	+	+	+	+
n-$C_{18}^{=}$	13,0	12,8	10,4	7,6
n-C_{18}	6,3	4,0	5,2	1,7
n-$C_{19}^{=}$	+	+	+	+
n-C_{19}	+	+	+	+
n-$C_{20}^{=}$	+	+	+	+
n-C_{20}	+	+	+	+
n-C_{22}	+	+	+	-

= bedeutet eine Doppelbindung, + in Spuren bzw. bis zu 1% vorhanden.

Vorgenannte Arbeiten haben sich hauptsächlich mit der Methodik und praktikablen Durchführung von Hautfettanalysen beschäftigt und die Ergebnisse summarisch oder in Näherungswerten angegeben. Des weiteren wurde die Herkunft des Hautfettes zu wenig berücksichtigt, im Höchstfall wurde zwischen männlichen und weiblichen Personen unterschieden.
Weitere Differenzierungen der Versuchspersonen, wie z.B. jung oder alt, gesund oder krank, jahreszeitlich bedingter verminderter oder erhöhter Schweißtransport und damit zusammenhängende körperliche Beanspruchung, der Monatszyklus der Frau und ernährungsphysiologische Aspekte blieben weitgehend unbeachtet.
Auf Unterschiede in der Zusammensetzung des Hautoberflächenfettes weisen BOUGHTON u. WHEATLEY[9] in ihrer Veröffentlichung hin, in der sie die Versuchspersonen getrennt nach Alter und Geschlecht sowie unter Berücksichtigung des Monatszyklus der Frau untersuchten.
Eine ganze Reihe von Autoren[13-16] beschäftigte sich nur mit den freien Fettsäuren des Hautfettes, andere[17-18] untersuchten die Gesamtmenge der Fettsäuren, also freie und gebundene zusammen.
Wieder andere[9, 19-20] wiesen freie und gebundene Fettsäuren getrennt nach, wobei allerdings die gebundenen Fettsäuren, die von verschiedenen Fettsäurederivaten (Triglyceriden, Mono-Diglyceriden, Wachs- und Cholesterinestern) stammen können, vorher nicht aufgetrennt wurden.

---

13) E. HAAHTI, T. NIKKARI u. O. KOSKINEN, Scand. J. clin. Lab. Invest. 12, 249 (1960)
14) E. HAAHTI, E.C. HORNING u. O. CASTREN, Scand. J. clin. Lab. Invest. 14, 368 (1962)
15) G. STÜTTGEN u. K.H. VOGELBERG, Arch. klin. exp. Derm. 222, 43 (1965)
16) S. RUST, P. HARTH u. F. HERRMANN, Arch. klin. exp. Derm. 231, 300 (1968)
17) B. BOUGHTON u. V.R. WHEATLEY, Biochem. J. 73, 144 (1959)
18) R.P. REINERTSON u. V.R. WHEATLEY, J. invest. Dermatol. 32, 49 (1959)
19) E. HAAHTI, Scand. J. clin. Lab. Invest. 13, Suppl. 59 (1961)
20) N. NICOLAIDES u. T. RAY, J. Amer. Oil Chemists' Soc. 42, 702 (1965)

PETER und Mitarb.[21] berichten über die Bestimmung der Talgdrüsenlipide; sie konnten in isolierten Talgdrüsen mittels Säulen-, Dünnschicht- und Gaschromatographie freie Fettsäuren, Triglyceride, Wachsester, Phosphatide, Cholesterin und Squalen nachweisen. Quantitativ bestimmten sie hiervon die freien und die an Triglyceride und Wachsester gebundenen Fettsäuren.

Auch über die Zusammensetzung des Hautoberflächenfettes bei verschiedenen Hautkrankheiten wurde berichtet und teilweise wurde mit dem Hautfett von gesunden Personen verglichen.
So gibt BARBER[22] 1936 schon erste Hinweise darauf , daß sich der Aufbau des Hautfettes von an Akne und Seborrhoe erkrankten Personen von dem der gesunden Personen unterscheidet. 1953 stellten WHEATLEY und Mitarb.[23] bei Seborrhoikern leichte Unterschiede im Aufbau des Hautoberflächenfettes fest und vermuteten, daß die Anteile der ungesättigten Fettsäuren sehr wahrscheinlich zurückgegangen sind. Die angewandte Analysenmethode erlaubte aber keine detaillierte Aussage.
1959 beschäftigten sich WHEATLEY und Mitarb.[24] wieder mit Seborrhoe-, aber auch mit Akne-Hautfett, untersuchten dieses Mal aber auch nur die freien Fettsäuren und die gebundenen Fettsäuren insgesamt. Bei dem Seborrhoehautfett bestätigte sich obige Vermutung, während im Aknehautfett auch nach einer Behandlung mit Gonadotropin kein nennenswerter Unterschied in der Zusammensetzung der Fettsäuren in bezug auf die Fettsäuren von Normalhautfett festzustellen war.
NICOLAIDES und Mitarb.[25] verglichen die Zusammensetzung des Sekrets

---

21) G. PETER, F. SCHRÖPL, R. LIPPROSS u. G. WEISS, Arch. klin. exp. Derm. 239, 12 (1970)
22) H.W. BARBER, The seborrhoeic state. Taylor's Practice of Medicine, 15.Ausgabe, 854. London, J. u. A. CHURCHILL, 1936
23) V.R. WHEATLEY, I.S. HODGSON-JONES, R.M.B. MACKENNA, Brit. J. Dermatol. 65, 246 (1953)
24) B. BOUGHTON, R.M.B. MACKENNA, V.R. WHEATLEY u. A. WORMALL, J. invest. Dermatol. 33, 57 (1959)
25) N. NICOLAIDES, M.N.A. ANSARI, HWEI C. FU u. D.G. LINDSAY, J. invest. Dermatol. 54, 487 (1970)

von Mitessern mit dem Oberflächenhautfett von Aknepatienten anhand der freien Fettsäuren, der Fettsäuren aus den Triglyceriden und der Wachsester.

In den Mitessern sind 55% freie Fettsäuren, aber nur 7% Triglyceride, im Hautoberflächenfett sind umgekehrt nur 16% freie Fettsäuren, dafür aber 47% Triglyceride (Mittelwert von 3 Versuchspersonen) enthalten. Die freien Fettsäuren der Mitesser und des Aknehautfettes gleichen sich mit Ausnahme der wenig mehr vorhandenen ungesättigten Fettsäuren im Aknehautfett.

Da in der uns zugänglichen Literatur kein genauer Hinweis über die vollständige Auftrennung bzw. Zusammensetzung der freien und vor allem der gebundenen Fettsäuren und ein Vergleich dieser Fettsäuren mit gesunden und an Akne erkrankten Personen gefunden werden konnte, war es Aufgabe der vorliegenden Arbeit, die Zusammensetzung bzw. die mögliche Veränderung der im Hautoberflächenfett enthaltenen freien und gebundenen Fettsäuren von gesunden und an Akne erkrankten Personen sowohl qualitativ wie auch quantitativ zu ermitteln.

TEXT-TEIL

VERZEICHNIS DER HÄUFIG VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

dc	=	dünnschichtchromatographisch
DC	=	Dünnschicht-chromatographie oder -chromatogramm
=	=	Doppelbindung
gc	=	gaschromatographisch
GC	=	Gas-chromatographie oder -chromatogramm
PÄ	=	Petroläther Sdp. 50-70°
sc	=	säulenchromatographisch
SC	=	Säulenchromatographie

A. GEWINNUNG UND ISOLIERUNG DES HAUTOBERFLÄCHENFETTES

Die Oberflächenlipoide der Haut, im Verlauf der Arbeit kurz als Hautfette bezeichnet, stammen von fünf gesunden und fünf an Akne erkrankten, männlichen Versuchspersonen im Alter von 17-31 Jahren[+].
Mit Rücksicht auf das bevorzugte Auftreten der Akne auf Stirn und Rücken wurden sämtliche Hautfettproben von diesen Hautpartien gesammelt.

Die betreffenden Hautflächen wurden mit einem mit Äther getränkten Wattebausch unter ganz leichtem Druck abgerieben, die Watte in eine Soxhlet-Hülse gebracht und das Hautfett im Soxhlet-Apparat mit Äther extrahiert. Das Lösungsmittel wurde bei Zimmertemperatur im Vakuum vorsichtig abgedampft und der Rückstand gewogen.
Um die für den Analysengang erforderlichen 100-200 mg Hautfettmengen zu erhalten, war bei täglicher Abreibung eine Zeit von 3 - 5 Wochen notwendig.

Da sich das Hautfett bei täglicher Abreibung nur teilweise regenerieren kann, waren längere Behandlungszeiten der Versuchspersonen nötig als Tab. 4 den Anschein erweckt.

[+] Meinen Kollegen aus dem Arbeitskreis und den Schülern des Kepler-Gymnasiums Tübingen sei für die Bereithaltung als Versuchspersonen herzlich gedankt.

Tabelle 4

Vergleich der nach einmaliger Abreibung gewonnenen Hautfettmengen der fünf gesunden (Normalhautfett) und der fünf an Akne erkrankten Personen (Aknehautfett), aus dem hervorgeht, daß die an Akne erkrankten Personen um etwa 15% mehr Hautfett besitzen.

Versuchsperson	Alter (Jahre)	Fläche (cm^2)	Hautfett (mg)	Hautfett auf 1000 cm^2 umgerechnet (mg)
Normalhautfett				
1	28	950	13,3	14,0
2	25	950	12,8	13,5
3	27	900	10,9	12,1
4	31	1100	14,5	13,2
5	27	1100	14,2	12,9
Aknehautfett				
1	30	950	14,5	15,2
2	18	1000	16,4	16,4
3	17	900	13,8	15,3
4	18	850	13,1	15,4
5	17	800	11,5	14,3

B. METHODIK DES ANALYSENGANGES

Die Hautfettanalyse beruht im Prinzip auf einer säulenchromatographischen Trennung an Kieselgel bzw. Aluminiumoxid mittels Gradientenelution. Das hierdurch in die einzelnen Komponenten zerlegte Hautfett wird dann durch DC, GC und IR-Spektroskopie weiter verfolgt.

Vor der sc Trennung wurden die wasserlöslichen, die petrolätherunlöslichen Bestandteile und die freien Fettsäuren abgetrennt.

Dazu wurde der Hautfettextrakt in 100 ml PÄ aufgenommen, die wasserlöslichen Bestandteile (Harnstoff, Aminosäuren u.a.) wurden durch Ausschütteln mit 2 mal je 20 ml dest. Wasser entfernt, das Wasser abdestilliert und der Rückstand gewogen.

Der petrolätherunlösliche Rückstand (Phospholipoide, Cholesterin) wurde abfiltriert, im Exsikkator getrocknet und danach gewogen.
Aus der nun erhaltenen Petrolätherphase (I) ließen sich die freien Fettsäuren durch dreimaliges Ausschütteln mit je 20 ml 0,05n NaOH in 50proz. Äthanol als Salze abtrennen. Die vereinigten, alkalischen Auszüge wurden mit 50 ml PÄ ausgeschüttelt, der PÄ anschließend mit der PÄ-phase (I) vereinigt.
Die in der PÄ-phase (I) enthaltenen Substanzen wurden nach 3stdg. Trocknung des PÄ mit Natriumsulfat sc getrennt[12, 26].

I. Säulenchromatographische Trennung

Als Säulenmaterial diente "Kieselgel für SC, Korngröße 0,05 - 0,2 mm Merck", das durch 12stdg. Erhitzen bei 250° aktiviert wurde, und "neutrales Aluminiumoxid Woelm" das durch einen Wasserzusatz von 10% auf Aktivitätsstufe IV gebracht wurde.
Für die Garantie einer sauberen sc Trennung mußten sämtliche für die Gradientenelution benötigten Lösungsmittel vorher absolutiert werden.

Das aktivierte Kieselgel wurde mit PÄ angeschlämmt und ohne Blasenbildung in die Säule eingebracht. Für 10 mg Hautfett rechnet man mit 1 g Kieselgel.
Die PÄ-phase (I) wurde am rotierenden Verdampfer bis auf wenige ml vorsichtig eingeengt und mit einer Pipette unter Nachspülen mit PÄ quantitativ auf die Säule gebracht. Die Elution erfolgte nach untenstehender Abb. 1, die Tropfgeschwindigkeit der Säule betrug etwa 1 ml/Min.

---

26) Cl. FRANZKE, F. KRETZSCHMANN, B. RÜSTOW u. H. RUGENSTEIN, Pharmazie, 22, 487 (1967)

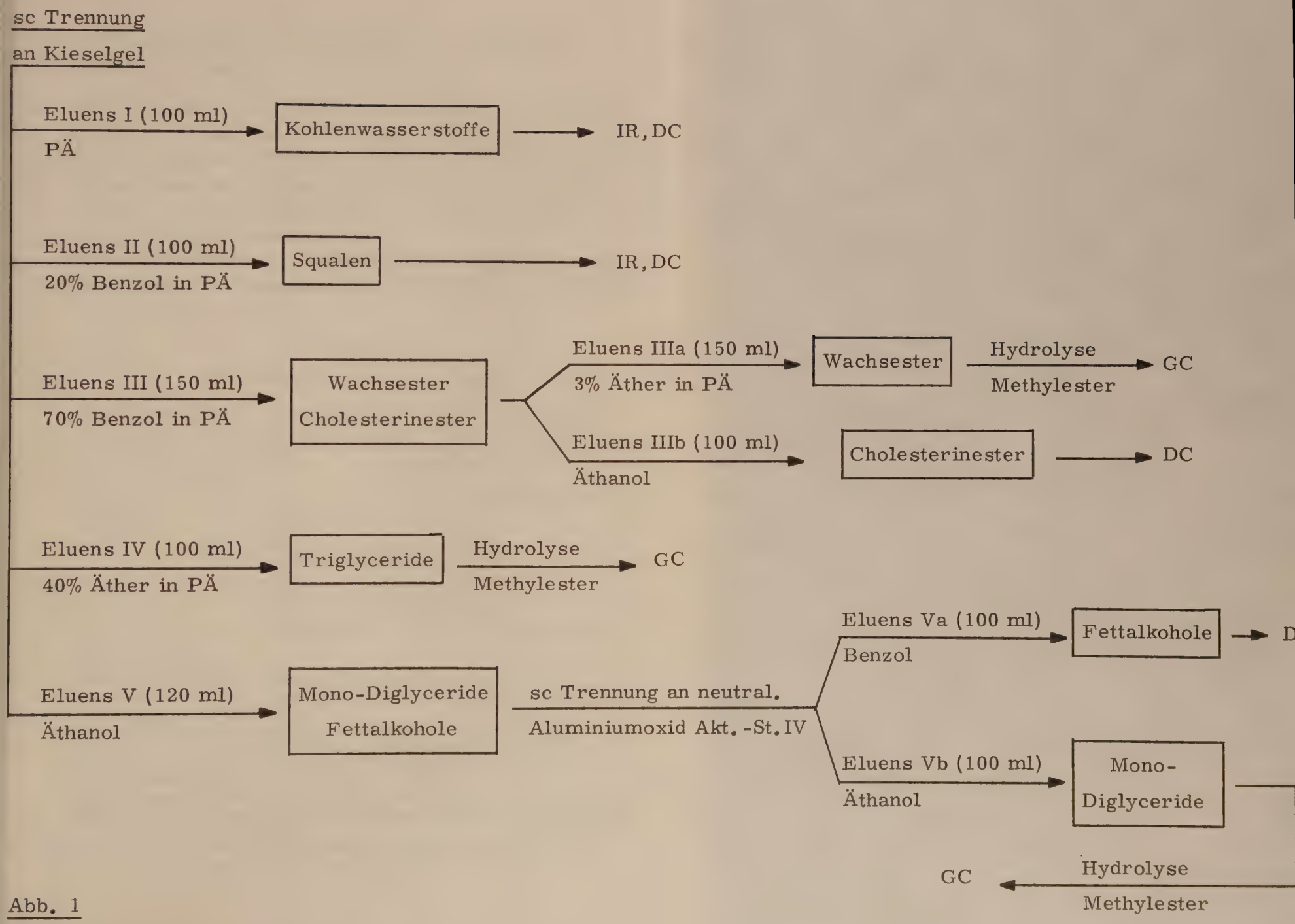

sc Trennung
an Kieselgel
Eluens I (100 ml)
PÄ
Kohlenwasserstoffe
IR, DC
Eluens II (100 ml)
20% Benzol in PÄ
Squalen
IR, DC
Eluens III (150 ml)
70% Benzol in PÄ
Wachsester
Cholesterinester
Eluens IIIa (150 ml)
3% Äther in PÄ
Wachsester
Hydrolyse
Methylester
GC
Eluens IIIb (100 ml)
Äthanol
Cholesterinester
DC
Eluens IV (100 ml)
40% Äther in PÄ
Triglyceride
Hydrolyse
Methylester
GC
Eluens V (120 ml)
Äthanol
Mono-Diglyceride
Fettalkohole
sc Trennung an neutral.
Aluminiumoxid Akt.-St. IV
Eluens Va (100 ml)
Benzol
Fettalkohole
Eluens Vb (100 ml)
Äthanol
Mono-
Diglyceride
GC
Hydrolyse
Methylester

Abb. 1

II. Dünnschichtchromatographische Prüfung des Hautfettes nach der sc Trennung

Aus der Vielzahl der Veröffentlichungen über die dc Analyse auf dem Fettgebiet seien nur jene erwähnt, die sich speziell mit dem hier vorliegenden Problem beschäftigen[27-34]. Nach E. STAHL[33] benutzten wir selbstgestrichene Platten mit "Kieselgel G MERCK" und die Fließmittel I (PÄ/Äther/Eisessig 90 + 10 + 1 Vol.) und II (Benzol/PÄ 7 + 4 Vol.). Die Detektion erfolgte mit Bromthymolblaulösung[29].

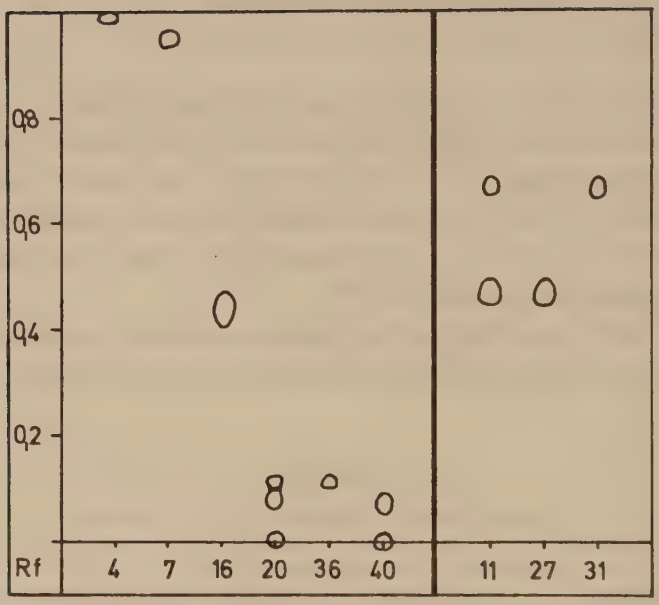
Die einwandfreie sc Trennung des Hautfettes durch die Gradientenelution wurde mittels DC der gesammelten Fraktionen überprüft (Tab. 5, Abb. 2).

Tabelle 5

Gesammelte Fraktionen der sc Trennung

Eluentien	Fraktionen	eluierte Hautfettkomponenten
I	1-5	Kohlenwasserstoffe
II	6-9	Squalen
III	10-14	Wachs- und Cholesterinester
IV	15-18	Triglyceride
V	19-23	Mono-Diglyceride, Fettalkohole
IIIa	24-29	Wachsester
IIIb	30-33	Cholesterinester
Va	34-38	Fettalkohole
Vb	39-43	Mono-Diglyceride

27) H.K. MANGOLD, J. Amer. Oil Chemists' Soc. 41, 762 (1964)
28) H.K. MANGOLD u. R. KAMMERECK, J. Amer. Oil Chemists'Soc. 39, 201 (1962)
29) H.K. MANGOLD, J. Amer. Oil Chemists'Soc. 38, 708 (1961)
30) TH.F. KELLEY, J. Chromatogr. (Amsterdam) 22, 456 (1966)
31) L.D. BUGELON, E.V. OGATLOVITSKAJA u. V.V. VORONKOVA, J. Chromatogr. (Amsterdam) 15, 191 (1964)
32) CL. FRANZKE, K.-O. HEIMS u. I. VOLLGRAF, Nahrung 11, 515 (1967)
33) E. STAHL, Dünnschichtchromatographie, ein Laboratoriumshandbuch, Springer-Verlag 1962
34) G.V. MARINETTI, Lipid Chromatographic Analysis, Band 1, Verlag Marcel Dekker, Inc., New York



Fließmittel I Fließmittel II

Abb. 2 DC der Fraktionen 1-43 der sc Trennung

Die dc Analyse (Abb. 2) ließ eine gute sc Trennung erkennen. Das Fließmittel I zeigte eine zufriedenstellende Trennung der Kohlenwasserstoffe, des Squalen, der Triglyceride, Mono-Diglyceride und der Fettalkohole, während das Fließmittelsystem II die Wachsester besser von den Cholesterinestern trennte.

Die Funktionsfähigkeit der sc Trennung und die jeweils für die Gradientenelution benötigten Lösungsmittelmengen wurden zuvor mit Hilfe einer dem Hautfett ähnlich zusammengesetzten Mischung von Referenzsubstanzen geprüft, und die saubere Trennung wurde mittels DC verfolgt. Die Versuche erbrachten mit den in Abb. 1 angegebenen Elutionsmittelmengen eine optimale Trennung. Der Verlust der nach erfolgter Trennung wiedergefundenen Menge an Referenzsubstanzen beträgt 1-4% und hängt von der Einwaage der einzelnen Modellsubstanzen ab. Dieser Verlust bildet die Fehler-

grenze bzw. die erreichbare Genauigkeit des Analysenverfahrens; mögliche Fehlerquellen sind Verluste bei der sc Trennung, der dc Prüfung, der weiteren Aufarbeitung der Proben und letztlich Wägefehler.

Die gesammelten Fraktionen der einzelnen Hautfettderivate wurden nach der dc Prüfung vereinigt, die diversen Lösungsmittel am rotierenden Verdampfer abdestilliert, der Rückstand wurde nach vollständiger Trocknung im Vakuumexsikkator gewogen.

Die interessierenden freien Fettsäuren, Triglyceride, Mono-Diglyceride und Wachsester wurden zur gc Analyse weiter aufgearbeitet.
Die außer den eben genannten sonst noch anfallenden Bestandteile des Hautfettes wurden nur summarisch angegeben und nicht näher untersucht.

Die vor dem sc Trennungsgang ausgeschüttelten, als Salze vorliegenden freien Fettsäuren wurden mit n-H_2SO_4 angesäuert, mit 3mal je 20 ml PÄ extrahiert und danach die vereinigten PÄ-auszüge zur Entfernung der Schwefelsäure 3mal mit je 10 ml dest. Wasser ausgewaschen. Nach 3stdg. Trocknen mit Na_2SO_4 wurde abfiltriert, der PÄ im rotierenden Verdampfer abdestilliert, der Rückstand im Exsikkator getrocknet und gewogen. Daran anschließend wurden die freien Fettsäuren wieder in 10 ml PÄ gelöst und mittels Diazomethan in die Methylester verwandelt.
Die an die Wachsester, Triglyceride und Mono-Diglyceride gebundenen Fettsäuren wurden zunächst hydrolysiert und danach gleichfalls methyliert.

III. Hydrolyse der Ester zur Gewinnung der Fettsäuren

Die Wachsester, Triglyceride und Mono-Diglyceride wurden jeweils mit 10 ml 0,5n äthanol. KOH versetzt und 1 Std. unter Rückfluß gekocht. Nach der Verseifung wurde mit 5 ml dest. Wasser verdünnt und im Scheidetrichter 1mal mit 10 ml PÄ zur Entfernung der Fettalkohole ausgeschüttelt. Die Seifenlösung wurde mit n-H_2SO_4 angesäuert und danach 3mal mit je

20 ml PÄ extrahiert, die vereinigten Auszüge wurden zur Entfernung der Schwefelsäure 3mal mit je 10 ml dest. Wasser ausgewaschen, 3 Std. mit Na_2SO_4 getrocknet, abfiltriert und im rotierenden Verdampfer auf 10 ml eingeengt.

IV. Darstellung der Fettsäuremethylester[35,36)]

Der petrolätherischen Lösung der Fettsäuren wurde 1 ml absol. Methanol zugesetzt. Eine aus Nitrosomethylharnstoff und KOH jeweils frisch bereitete Diazomethanlösung in trockenem Äther wurde tropfenweise der Fettsäurelösung bis zur bleibenden Gelbfärbung hinzugefügt. Nach 30 min. Stehen im Kühlschrank wurden überschüssiges Diazomethan und die Lösungsmittel vorsichtig im Vakuum abgezogen. Das zurückbleibende Estergemisch wurde vor der gc Analyse mehrere Stunden im Vakuumexsikkator über $CaCl_2$ getrocknet. Die Hydrolyse und anschließende Veresterung mittels Diazomethan wurde wieder mit Hilfe der DC (Fließmittel I) überprüft, beide Reaktionen verliefen quantitativ. Aus Tab. 6 sind die Rf-Werte zu entnehmen.

Tabelle 6

Fettsäurederivate	Rf-Werte
Triglyceride	0,43
Wachsester	0,94
Mono-Diglyceride	0,0; 0,11
nach Hydrolyse	
freie Fettsäuren	0,2
nach Veresterung	
Fettsäuremethylester	0,5

Rf-Werte der Fettsäurederivate nach Hydrolyse und Veresterung

35) H. WOIDICH, Z. Lebensmittel-Unters. u. -Forsch. 129, 197 (1966)
36) H. HADORN u. K. ZÜRCHER, Dtsch. Lebensmittel-Rdsch. 66, 77 (1970)

V. Gaschromatographische Trennung der Fettsäuremethylester

Vor der gc Analyse der Fettsäuremethylester der einzelnen Hautfettfraktionen mußten zwei Fragenkomplexe geklärt werden, einmal die der qualitativen Analyse und zum anderen die der quantitativen Auswertung der GC.

1. Qualitative Trennung

Als mögliches Säulenmaterial werden in der Literatur Säulen mit polaren Polyestern[34-42] und unpolaren Apiezonfetten[12, 34, 37-39] beschrieben.

Wir benutzten zur Trennung eine mit Apiezonfett L belegte 25 m-GOLAY-Kapillarsäule[+], die auch bei hohen Temperaturen thermostabil ist.

Die gc Untersuchungen wurden mit Flammenionisationsdetektor, mechanischem Integrator und Temperaturprogramm ausgeführt. Als Trägergas diente Stickstoff. Die beste Trennung ergab sich bei einem Gasdurchfluß von 1,5 ml/Min. und einem Splitverhältnis von 1 : 100.
Bei der breiten Skala der im Hautfett vorkommenden Fettsäuren und den folglich sehr unterschiedlichen Retentionszeiten erwies es sich als unerläßlich, mit einem Temperaturprogramm zu arbeiten. Würde man nämlich z.B. bei 100° chromatographieren, so würden - bedingt durch die zu lange Retentionszeit - die hohen Fettsäuren asymmetrische Peaks liefern. Bei 200° aber würden umgekehrt die niederen Fettsäuren so kurz hintereinander austreten, daß eine exakte Trennung bzw. quantitative Auswertung wieder nicht möglich wäre.

---

37) A.T. JAMES u. V.R. WHEATLEY, Biochem. J. 63, 269 (1956)
38) A.T. JAMES u. A.J.P. MARTIN, Biochem. J. 63, 144 (1956)
39) H.H. HOFSTETTER, N. SEN u. R.T. HOLMAN, J. Amer. Oil Chemists' Soc. 42, 537 (1965)
40) P. MARES, J. SKOREPA u. M. FRIDRICH, J. Chromatogr. (Amsterdam) 42, 435 (1969)
41) C.H. ORR u. J.E. CALLEN, J. Amer. chem. Soc. 80, 249 (1958)
42) R.A. LANDOWNE u. S.R. LIPSKY, Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 46, 1 (1961)

+) Säule der Fa. Perkin-Elmer, Bodenseewerk Überlingen

Aus einer Reihe geprüfter Temperaturprogramme erwies sich das in Abb. 3 gezeigte am günstigsten.

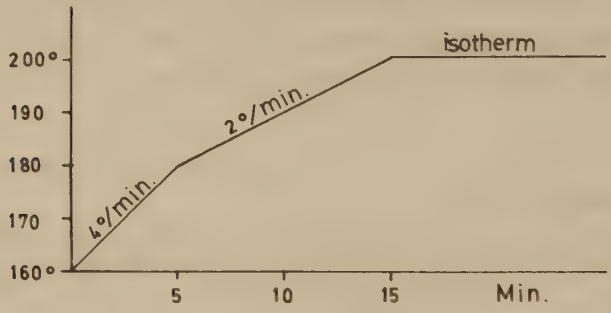


Abb. 3 Verwendetes Temperaturprogramm: Initialtemp. 160°, 5 Min. 4°/Min., 10 Min. 2°/Min. bis 200°, anschließend isotherm. Analysendauer 45 Min.

Unter diesen Bedingungen ließen sich die Fettsäuregemische der einzelnen Hautfettfraktionen, die in der 10fachen Menge Äther gelöst wurden, durch die gc Analyse gut als Fettsäuremethylester trennen, und zwar treten die verzweigten iso-Fettsäuren vor den ungesättigten und diese wiederum vor den gesättigten Fettsäuren aus.

Bei der Durchführung der Analysen wurde besonders auf die Einhaltung immer gleicher konstant gehaltener Bedingungen geachtet.

Tab. 7 gibt die gefundenen Retentionszeiten der wichtigsten Fettsäuremethylester aus den GC wieder, sie verstehen sich vom Ätherpeak bis zum Maximum der Substanzpeaks und sind in Min. angegeben.

Tabelle 7

Retentionszeiten der Fettsäuremethylester

Fettsäuren	t_r (Min.)	Fettsäuren	t_r (Min.)
n-C_{12}=	7,0	iso-C_{16}	16,5
n-C_{12}	8,0	n-C_{16}=	17,0
n-C_{13}	10,0	n-C_{16}	18,0
iso-C_{14}	10,5	iso-C_{17}	20,0
n-C_{14}=	11,0	n-C_{17}=	20,5
n-C_{14}	12,0	n-C_{17}	21,5
iso-C_{15}	13,5	n-C_{18}==	24,0
n-C_{15}=	14,0	n-C_{18}=	25,0
n-C_{15}	15,0	n-C_{18}	26,0

2. Identifizierung und quantitative Auswertung

Die richtige Identifizierung der Peaks wird laut Literaturangaben dadurch erleichtert, daß die Logarithmen der Retentionsvolumina homologer Reihen, in einem Diagramm gegen die Kettenlänge aufgetragen, Geraden ergeben sollen[43-47]. Unsere GOLAY-Säule wurde auf dieses Verhalten hin untersucht (Abb. 4), und es wurde festgestellt, daß die genannte Beziehung auf die Apiezonfett L-Säule nicht ganz zutrifft.

43) A.T. JAMES u. A.J. P. MARTIN, Biochem. J. 50, 679 (1952)
44) B.M. CRAIG u. N.L. MURTY, Canad. J. Chem. 36, 1297 (1958)
45) C.H. ORR u. J.E. CALLEN, Ann. N.Y. Trad. Sci. 72, 649 (1959)
46) R.G. ACKMAN, Nature (London) 194, 970 (1962); 195, 1198 (1962)
47) T.K. MIWA, J. Amer. Oil Chemists' Soc. 40, 309 (1963)

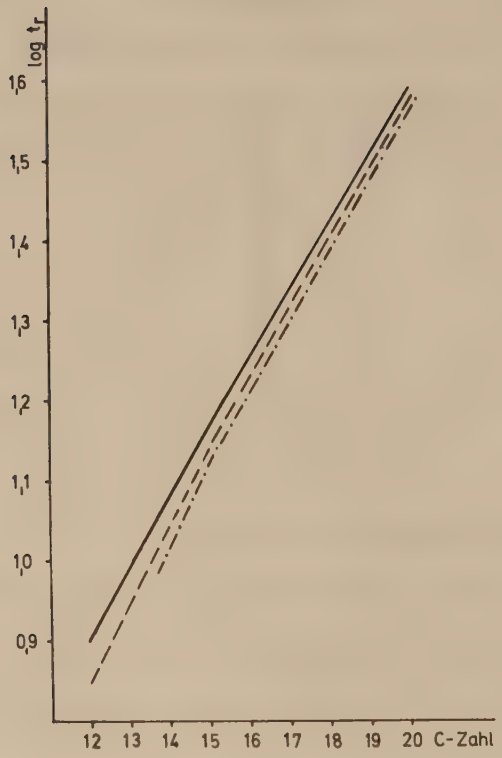


Abb. 4 Abhängigkeit zwischen log t_r und Anzahl der C-Atome

——— = gesättigte n-Fettsäuremethylester
- - - - - - - = ungesättigte n-Fettsäuremethylester
—·—·—·— = gesättigte iso-Fettsäuremethylester

Vielmehr ergibt sich für jede homologe Reihe eine andere Kurve, die zur Identifizierung der Fettsäuren insofern beiträgt, als man auf Grund der festgestellten Retentionszeiten die dazugehörige Anzahl der Kohlenstoffatome im Diagramm ablesen kann. Da sich die Retentionszeiten bei der geringsten Abweichung der vorgegebenen Bedingungen ändern und man somit für die homologen Reihen der Fettsäuren zu anders verlaufenden Kurven kommt, ist diese Methode natürlich nur als erster Anhaltspunkt für die Identifizierung geeignet.

Zuverlässiger war es, Vergleichschromatogramme mit authentischen Substanzen anzufertigen bzw. authentische Substanzen der zu untersuchenden Probe beizumischen und neuerlich zu chromatographieren. Anhand der Zunahme der Flächen der betreffenden Peaks, denen Modellsubstanzen zugemischt worden waren, konnten nun die einzelnen Fettsäuren identifiziert werden.
Solche Vergleichschromatogramme wurden jeweils für die Gruppe der freien Fettsäuren, der Triglyceride, der Mono-Diglyceride und der Wachsester des Normalhaut- und Aknehautfettes hergestellt.

Als Basis für die quantitative Auswertung der GC diente die Fläche unter der Schreiberkurve, in unserem Fall wurde die Bandenfläche von einem mechanischen DISC-Integrator mitgeschrieben.
Erste Versuche, die Flächen durch Planimetrieren, durch Ausschneiden und Wiegen, mit Hilfe des Produktes aus Höhe und Breite in halber Höhe und durch das Produkt aus Höhe und Retentionszeit zu bestimmen, scheiterten an der zu großen Ungenauigkeit dieser Methoden.
Gelegentlich seiner Untersuchungen über die verschiedenen Flächenbestimmungsmethoden kam JANAK[48] zu ähnlichen Ergebnissen, er zeigte auch, daß die Fehler weitgehend von der Form und Größe der Peaks abhängen. Die genauesten Resultate erzielte er mit mechanischen und elektronischen Integratoren, nämlich Fehlergrenzen von 23,4% für kleine Flächen (0-50 mm^2) bis herunter auf 1,3% für große Flächen (300-1000 mm^2), wobei steile, schmale Banden genauer bestimmt werden konnten als flache.

Da die Fettsäuremethylester auf der GOLAY-Säule, steile, symmetrische Peaks lieferten und man die Bandenfläche mittels Einstellung der Empfindlichkeit des GC auf gut meßbare Flächengröße variieren konnte, brachte die Auswertung durch den mechanischen Integrator Ergebnisse mit einer maximalen Abweichung von 5%.
Die so ermittelten Flächen müssen noch mit Eichfaktoren korrigiert werden, um die Gewichtsprozente der einzelnen Fettsäuren zu liefern, denn

---

48) J. JANAK, J. Chromatogr. (Amsterdam) 3, 308 (1960)

es besteht keine direkte Proportionalität zwischen der Bandenfläche und dem Prozentgehalt der zu ermittelnden Fettsäuren[49-53].

Die Faktoren für die Fettsäuren wurden für den FID mit der Formel nach R.G. ACKMAN[54] folgendermaßen berechnet:

$$f_E = \frac{M_E}{n_E \cdot 12}$$

M_E = Mol.-Gew. des Esters; n_E = Anzahl der Kohlenstoffatome im Ester.

Die Gewichtsprozente der einzelnen Bandenflächen werden also aus dem prozentualen Gehalt an ionenbildendem Kohlenstoff berechnet.

Tabelle 8

Umrechnungsfaktoren für Fettsäuremethylester

Fettsäuren	f
$C_{12}{}^{=}$	1,359
C_{12}	1,371
$C_{14}{}^{=}$	1,333
C_{14}	1,344
$C_{15}{}^{=}$	1,323
C_{15}	1,333
$C_{16}{}^{=}$	1,313
C_{16}	1,323
$C_{17}{}^{=}$	1,305
C_{17}	1,314
$C_{18}{}^{==}$	1,289
$C_{18}{}^{=}$	1,298
C_{18}	1,307

49) C.J.F. BÖTTCHER, G.F.G. CLEMENS u. C.M. VAN GENT, J. Chromatogr. (Amsterdam) 3, 582 (1960)

50) M.L. VORBECK, L.R. MATTICK, F.A. LEE u. C.S. PEDERSON, Analytic. Chem. 33, 1512 (1961)

51) H.P. KAUFMANN, A. SEHER u. G. MANKEL, Fette-Seifen-Anstrichmittel 64, 501 (1962)

52) A. SEHER, Fette-Seifen-Anstrichmittel 68, 255 (1966)

53) R. KAISER, Chromatographie in der Gasphase, Band III, 134 Bibliographisches Institut Mannheim 1962

54) R.G. ACKMAN, J. Gas-Chromatogr. 2, 173 (1964)

Aus den jeweiligen durch den Integrator mitgeschriebenen Bandenflächen der einzelnen Ester wurden die Prozente Fettsäuremethylester im Analysengemisch wie folgt berechnet:

$$\% E = \frac{100 \cdot f_E \cdot F_E}{\Sigma_1^x f \cdot F}$$

E = Fettsäuremethylester E; F_E = Peakfläche von E

Die Notwendigkeit einer Flächenkorrektur mittels Eichfaktoren geben nachfolgende Tabellen deutlich wieder, in denen verschiedene Eichgemische bekannter Zusammensetzung und Konzentration chromatographiert wurden. In den Tabellen 9a-e wurden die Flächenprozente und die korrigierten Ergebnisse den gegebenen Gewichtsprozenten einiger Eichgemische gegenübergestellt.

Tabelle 9a-e

Quantitative GC-Auswertung verschiedener Fettsäuremethylester-Eichgemische

Tabelle 9a

Fettsäure	Flächen-% unkorrigiert	Gew.-% gegeben	Gew.-%, gef. korrigiert
C_7	12,7	14,3	13,8
C_8	13,8	14,3	14,3
C_9	14,2	14,3	14,4
C_{10}	14,4	14,3	14,4
C_{11}	14,9	14,3	14,6
C_{12}	14,9	14,3	14,4
C_{13}	15,0	14,3	14,3

Tabelle 9b

Fettsäure	Flächen-% unkorrigiert	Gew.-% gegeben	Gew.-%, gef. korrigiert
C_7	6,3	7,4	6,8
C_8	14,0	14,8	14,6
C_9	11,0	11,1	11,2
C_{10}	23,0	22,2	23,0
C_{11}	7,1	7,4	7,0
C_{12}	15,2	14,8	14,8
C_{13}	23,4	22,2	22,5

Tabelle 9c

Fettsäure	Flächen-% unkorrigiert	Gew.-% gegeben	Gew.-%, gef. korrigiert
C_7	13,3	14,8	14,1
C_8	7,1	7,4	7,4
C_9	21,8	22,1	22,1
C_{10}	11,9	11,3	11,8
C_{11}	22,9	22,2	22,4
C_{12}	15,2	14,7	14,7
C_{13}	7,8	7,4	7,4

Tabelle 9d

Fettsäure	Flächen-% unkorrigiert	Gew.-% gegeben	Gew.-%, gef. korrigiert
C_{12}	5,7	6,1	5,9
C_{14}	12,3	12,7	12,5
C_{15}	18,0	18,4	18,1
C_{16}	30,1	29,5	30,0
C_{17}	11,2	11,0	11,0
C_{18}	22,7	22,3	22,4

Tabelle 9e

Fettsäure	Flächen-% unkorrigiert	Gew.-% gegeben	Gew.-%, gef. korrigiert
$C_{12}^{=}$	8,0	8,5	8,2
C_{12}	17,0	17,7	17,6
C_{16}	21,4	21,0	21,2
C_{16}	15,3	15,5	15,3
$C_{18}^{==}$	5,5	5,3	5,4
$C_{18}^{=}$	21,0	20,4	20,6
C_{18}	11,8	11,6	11,6

C. ANALYSENERGEBNISSE DER NORMALHAUTFETTE

Zu Beginn der Normalhautfett-Analysen stehen in Abb. 5a-d stellvertretend für sämtliche fünf Normalhautfette die GC der einzelnen untersuchten Substanzklassen.

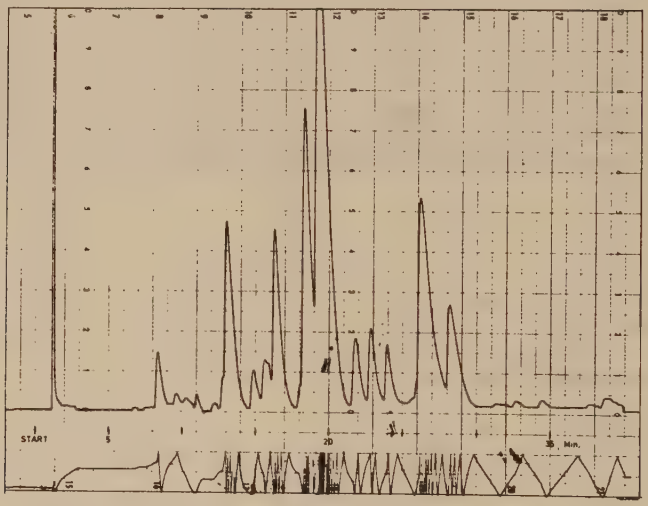


Abb. 5a Methylester der freien Fettsäuren

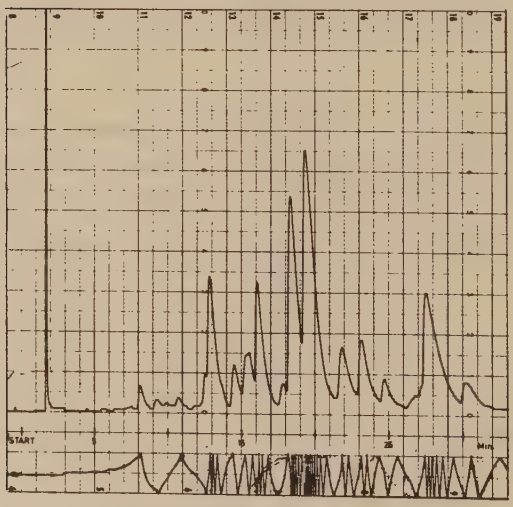


Abb. 5b Fettsäuremethylester aus Triglyceriden

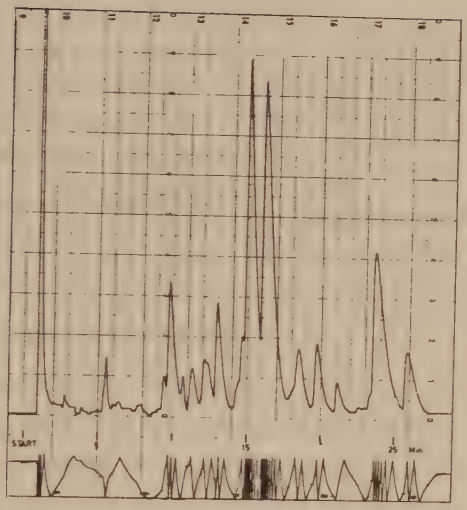


Abb. 5c Fettsäuremethylester aus Mono-Diglyceriden

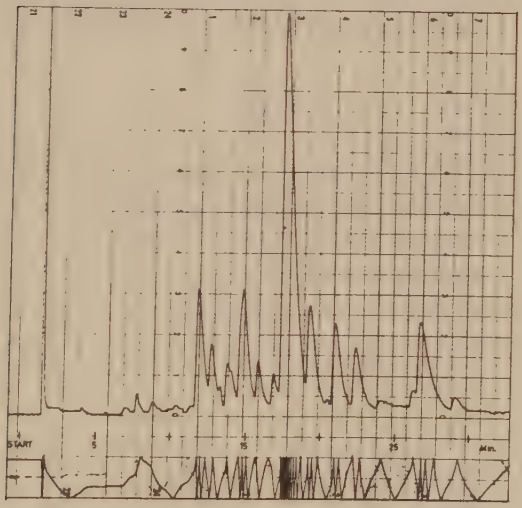


Abb. 5d Fettsäuremethylester aus Wachsestern

NORMALHAUTFETT-ANALYSEN

Patient	1		2		3		4		5		
Einwaage (mg)	209		192		176		206		166		Mittel-wert $\bar{x}$
Substanzen	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	%
wasserlösl. Bestandteile	1,9	0,9	7,0	3,7	2,4	1,4	4,2	2,0	2,8	1,7	1,92
petroläther-unlösl. Bestand-teile	11,4	5,5	14,1	7,4	9,4	5,3	9,7	4,7	10,3	6,2	5,8
freie Fettsäuren	58,3	27,9	43,5	22,8	43,7	24,9	52,7	25,5	36,0	21,6	24,54
Kohlen-wasserstoffe	2,3	1,1	3,8	2,0	3,7	2,1	4,6	2,2	4,3	2,6	2,0
Squalen	17,7	8,5	17,4	9,1	22,1	12,5	20,2	9,8	14,6	8,8	9,76
Triglyceride	41,7	20,0	45,2	23,7	34,7	19,7	47,7	23,1	41,5	24,9	22,28
Mono-Diglyceride	21,2	10,1	18,0	9,4	21,4	12,1	21,4	10,4	19,9	11,9	10,82
Fettalkohole	0,8	0,4	1,0	0,5	0,9	0,5	1,0	0,5	0,7	0,4	0,46
Wachsester	48,3	23,1	36,8	19,3	32,2	18,3	38,8	18,8	31,7	19,1	19,7
Cholesterin-ester	5,3	2,5	4,0	2,1	4,5	2,5	4,6	2,2	3,3	2,0	2,28

VERTEILUNG DER FREIEN UND GEBUNDENEN FETTSÄUREN DER NORMALHAUTFETTE IN GEW.-%

Fettsäure	Patient	freie Fettsäuren	Fettsäuren aus Triglyceriden	Fettsäuren aus Mono-Diglyc.	Fettsäuren aus Wachsestern
n-C_{10}	1		+		
	2	+	+		+
	3	+	+	+	+
	4	+	+	+	+
	5	+	+	+	+
n-C_{11}=	1	+	+		
	2	+	+		
	3	+	+	+	+
	4	+	+	+	+
	5	+	+	+	+
n-C_{11}	1	+	+		
	2	+	+		+
	3	+	+	+	+
	4	+	+	+	+
	5	+	+	+	+
n-C_{12}=	1	+	+		+
	2	+	+		+
	3	+	+	+	+
	4	+	+	+	+
	5	+	+	+	+
n-C_{12}	1	1,5	1,3	+	+
	2	1,4	1,2	1,1	+
	3	1,1	0,8	1,1	+
	4	1,0	1,3	1,6	+
	5	1,4	1,3	1,5	+
	$\bar{x}$	1,28	1,18	1,2	
iso-C_{13}	1	+	+	+	+
	2	+	+	+	+
	3	+	+	+	+
	4	+	+	+	+
	5	+	+	+	+

+ = in Spuren bis zu 0,5% vorhanden

Fettsäure	Patient	freie Fettsäuren	Fettsäuren aus Triglyceriden	Fettsäuren aus Mono-Diglyc.	Fettsäuren aus Wachsestern
n-$C_{13}^{=}$	1	+	+	+	+
	2	+	+	+	+
	3	+	+	+	+
	4	+	+	+	+
	5	+	+	+	+
n-C_{13}	1	+	+	+	+
	2	+	+	+	+
	3	+	+	+	+
	4	+	+	+	+
	5	+	+	+	+
iso-C_{14}	1	+	+	+	+
	2	+	+	+	+
	3	+	+	+	+
	4	+	+	+	+
	5	+	+	+	+
n-$C_{14}^{=}$	1	2,5	1,6	1,0	6,3
	2	+	0,9	1,0	6,4
	3	+	1,6	1,0	6,3
	4	+	1,0	1,1	5,1
	5	+	1,0	1,2	7,1
	$\bar{x}$		1,22	1,06	6,24
n-C_{14}	1	11,9	7,2	5,3	5,5
	2	9,3	6,9	7,1	3,8
	3	9,6	6,5	7,0	4,2
	4	9,3	7,6	7,1	3,9
	5	9,5	8,3	8,0	3,9
	$\bar{x}$	9,92	7,3	6,9	4,26
iso-C_{15}	1	2,0	3,5	2,7	2,5
	2	1,7	2,2	2,2	3,0
	3	1,5	2,5	2,3	2,9
	4	2,2	2,4	1,7	2,7
	5	1,5	2,4	2,4	3,3
	$\bar{x}$	1,78	2,6	2,26	2,88

Fettsäure	Patient	freie Fettsäuren	Fettsäuren aus Triglyceriden	Fettsäuren aus Mono-Diglyc.	Fettsäuren aus Wachsestern
$n\text{-}C_{15}{}^{=}$	1	4,0	4,2	3,2	7,5
	2	3,2	3,5	3,5	7,4
	3	2,2	3,7	3,7	6,5
	4	2,5	3,0	3,3	6,7
	5	2,5	4,3	4,0	8,4
	$\bar{x}$	2,88	3,74	3,54	7,3
$n\text{-}C_{15}$	1	6,5	5,7	4,3	3,3
	2	8,0	6,4	5,3	2,1
	3	7,8	6,0	6,2	2,6
	4	8,3	7,2	5,3	3,3
	5	8,9	8,0	6,9	2,9
	$\bar{x}$	7,9	6,66	5,6	2,84
$iso\text{-}C_{16}$	1	+	+	1,3	+
	2	+	3,7	2,5	3,0
	3	+	1,4	1,3	1,5
	4	+	1,0	0,7	0,8
	5	+	1,5	1,4	1,8
	$\bar{x}$		1,72	1,44	1,62
$n\text{-}C_{16}{}^{=}$	1	18,5	19,6	17,9	39,8
	2	11,2	17,6	19,7	38,6
	3	13,3	15,8	15,3	37,4
	4	10,7	14,0	16,5	37,1
	5	8,7	14,0	15,3	35,5
	$\bar{x}$	12,48	16,2	16,94	37,68
$n\text{-}C_{16}$	1	30,0	23,3	17,5	11,3
	2	35,2	24,6	23,8	8,3
	3	30,6	22,1	24,3	9,5
	4	35,0	27,4	24,8	11,0
	5	34,2	23,6	24,6	8,2
	$\bar{x}$	33,0	24,2	23,0	9,66
$iso\text{-}C_{17}$	1	2,3	4,5	6,0	3,6
	2	3,0	4,5	4,9	7,0
	3	3,1	4,8	4,0	6,2
	4	3,9	4,3	4,3	5,5
	5	3,1	5,5	4,7	6,4
	$\bar{x}$	3,08	4,72	4,78	5,74

Fettsäure	Patient	freie Fettsäuren	Fettsäuren aus Triglyceriden	Fettsäuren aus Mono-Diglyc.	Fettsäuren aus Wachsestern
n-$C_{17}^{=}$	1	3,0	4,0	5,0	3,0
	2	3,5	4,9	4,2	4,3
	3	3,5	5,0	4,1	5,8
	4	3,7	4,5	4,5	5,0
	5	3,6	5,9	6,1	5,0
	$\bar{x}$	3,46	4,86	4,78	4,62
n-C_{17}	1	2,2	2,0	1,9	0,6
	2	1,8	2,3	1,8	+
	3	2,8	3,0	2,6	+
	4	2,3	2,3	2,4	0,8
	5	2,6	2,9	3,1	1,4
	$\bar{x}$	2,34	2,5	2,36	0,96
n-$C_{18}^{==}$	1	1,0	+	1,9	0,9
	2	+	0,9	+	+
	3	+	1,5	+	1,2
	4	+	1,1	0,8	1,2
	5	+	1,1	+	1,2
	$\bar{x}$	0,84	1,12	1,02	1,1
n-$C_{18}^{=}$	1	9,2	13,1	21,1	10,5
	2	13,0	14,8	13,9	9,2
	3	15,6	15,5	14,8	11,4
	4	11,3	14,7	15,5	12,4
	5	13,3	14,4	13,9	9,4
	$\bar{x}$	12,48	14,5	15,84	10,58
n-C_{18}	1	3,2	3,3	4,3	1,9
	2	5,9	3,2	5,0	2,4
	3	7,0	5,0	5,6	2,5
	4	5,7	4,1	6,5	2,4
	5	8,5	3,7	4,0	2,6
	$\bar{x}$	6,06	3,86	5,08	2,36
iso-C_{19}	1		+		
	2		+		
	3		+		
	4		+		
	5		+		

Fettsäure	Patient	freie Fettsäuren	Fettsäuren aus Triglyceriden	Fettsäuren aus Mono-Diglyc.	Fettsäuren aus Wachsestern
$n\text{-}C_{19}^{=}$	1	+	+	+	+
	2	+	+	+	+
	3	+	+	+	+
	4	+	+	+	+
	5	+	+	+	+
$n\text{-}C_{19}$	1	+	+	+	+
	2	+	+	+	+
	3	+	+	+	+
	4	+	+	+	+
	5	+	+	+	+
$iso\text{-}C_{20}$	1			+	
	2			+	
	3			+	
	4			+	
	5			+	
$n\text{-}C_{20}^{=}$	1		+	+	+
	2	+	+	+	+
	3	+	+	+	+
	4	+	+	+	+
	5	+	+	+	+
$n\text{-}C_{20}$	1		+	+	+
	2	+	+	+	+
	3	+	+	+	+
	4	+	+	+	+
	5	+	+	+	+

D. ANALYSENERGEBNISSE DER AKNEHAUTFETTE

Vor den Ergebnissen der Aknehautfett-Analysen seien wiederum in Abb. 6a-d die GC der Fettsäuremethylester der interessierenden Fettsäurederivate angeführt.

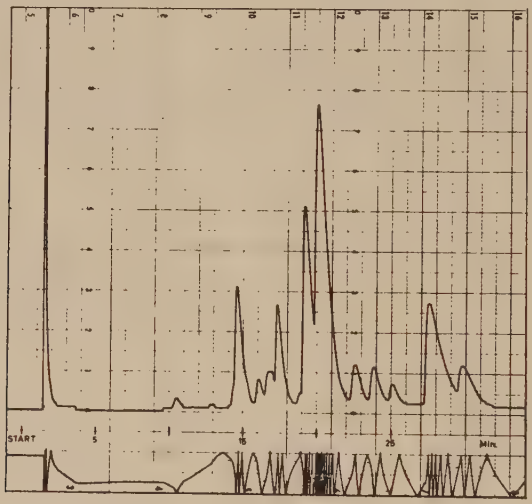


Abb. 6a Methylester der freien Fettsäuren

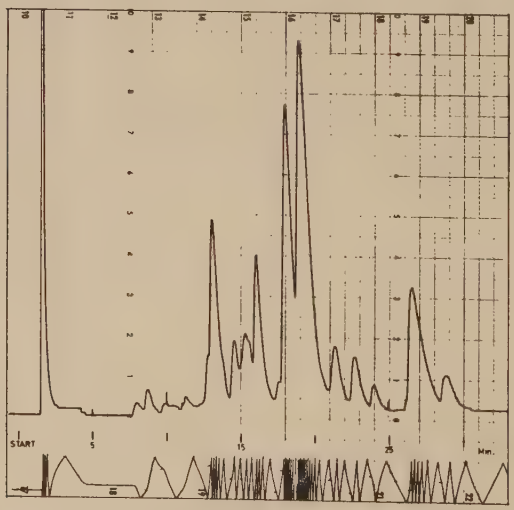


Abb. 6b Fettsäuremethylester aus Triglyceriden

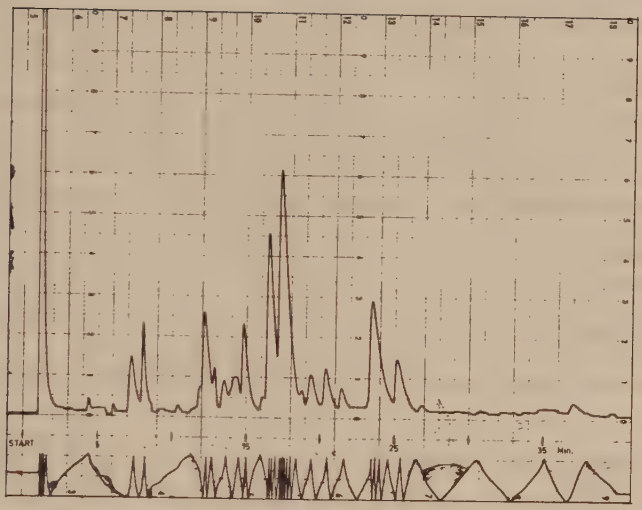


Abb. 6c Fettsäuremethylester aus Mono-Diglyceriden

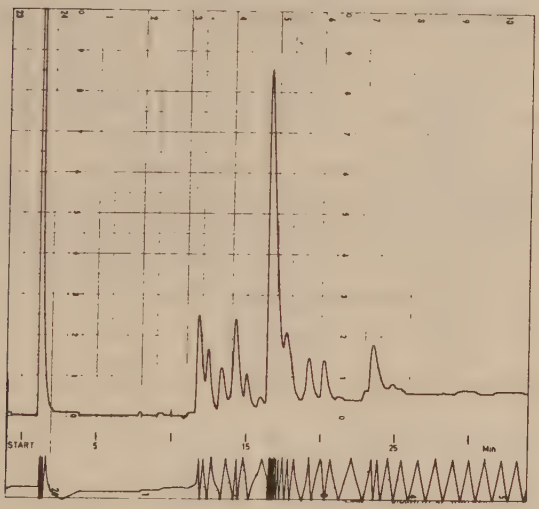


Abb. 6d Fettsäuremethylester aus Wachsestern

AKNEHAUTFETT-ANALYSEN

Patient	1		2		3		4		5		
Einwaage (mg)	144,0		160,0		171,0		158,0		176,0		Mittelwert x̄
Substanzen	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	%
wasserlösl. Bestandteile	5,2	3,6	5,6	3,5	5,6	3,3	5,5	3,5	5,8	3,3	3,44
petroläther-unlösl. Bestandteile	8,6	6,0	6,2	3,9	8,5	5,0	7,0	4,5	8,4	4,8	4,84
freie Fettsäuren	16,7	11,6	28,3	17,7	28,1	16,5	27,0	17,2	30,1	17,2	16,04
Kohlenwasserstoffe	6,0	4,2	5,6	3,5	6,7	3,9	6,1	3,9	6,5	3,7	3,84
Squalen	20,4	14,2	21,2	13,2	20,4	12,0	19,0	12,1	20,4	11,7	12,64
Triglyceride	46,1	32,0	45,0	28,1	50,1	29,5	44,7	28,5	51,3	29,4	29,5
Mono-Diglyceride	12,6	8,8	15,1	9,4	15,6	9,2	16,5	10,5	16,1	9,2	9,42
Fettalkohole	0,5	0,4	0,7	0,4	0,8	0,5	0,7	0,5	0,9	0,5	0,46
Wachsester	23,3	16,2	28,7	17,8	29,8	17,5	27,0	17,2	30,5	17,5	17,24
Cholesterinester	3,6	2,5	3,1	2,0	3,7	2,2	3,6	2,3	4,3	2,5	2,3

VERTEILUNG DER FREIEN UND GEBUNDENEN FETTSÄUREN DER AKNEHAUTFETTE IN GEW.-%

Fettsäure	Patient	freie Fettsäuren	Fettsäuren aus Triglyceriden	Fettsäuren aus Mono-Diglyc.	Fettsäuren aus Wachsestern
n-C_{10}	1	+	+	+	+
	2	+	+	+	+
	3	+	+	+	+
	4	+	+	+	+
	5	+	+	+	+
n-$C_{11}^{=}$	1	+	+	+	+
	2	+	+	+	+
	3	+	+	+	+
	4	+	+	+	+
	5	+	+	+	+
n-C_{11}	1	+	+	+	+
	2	+	+	+	+
	3	+	+	+	+
	4	+	+	+	+
	5	+	+	+	+
n-$C_{12}^{=}$	1	+	+	1,9	+
	2	+	+	1,5	+
	3	+	+	1,4	+
	4	+	+	0,9	+
	5	+	+	1,2	+
	$\bar{x}$			1,38	
n-C_{12}	1	2,2	1,2	2,2	0,8
	2	1,6	1,1	1,9	0,5
	3	1,4	1,1	1,9	0,9
	4	0,9	1,4	1,7	1,0
	5	2,0	0,7	1,5	1,0
	$\bar{x}$	1,62	1,1	1,84	0,84
iso-C_{13}	1	+	+	+	+
	2	+	+	+	+
	3	+	+	+	+
	4	+	+	+	+
	5	+	+	+	+

Fettsäure	Patient	freie Fettsäuren	Fettsäuren aus Triglyceriden	Fettsäuren aus Mono-Diglyc.	Fettsäuren aus Wachsestern
$n\text{-}C_{13}^{=}$	1	+	+	+	+
	2	+	+	+	+
	3	+	+	+	+
	4	+	+	+	+
	5	+	+	+	+
$n\text{-}C_{13}$	1	+	+	+	+
	2	+	+	+	+
	3	+	+	+	+
	4	+	+	+	+
	5	+	+	+	+
$iso\text{-}C_{14}$	1	+	+	+	+
	2	+	+	+	+
	3	+	+	+	+
	4	+	+	+	+
	5	+	+	+	+
$n\text{-}C_{14}^{=}$	1	+	1,0	1,0	5,8
	2	+	0,8	1,3	7,3
	3	+	1,0	1,2	6,3
	4	+	1,1	1,4	7,1
	5	+	1,3	1,0	6,8
	$\bar{x}$		1,04	1,18	6,66
$n\text{-}C_{14}$	1	9,0	9,6	9,1	3,8
	2	10,2	10,5	8,9	4,5
	3	10,7	10,0	7,4	5,3
	4	8,9	10,7	8,9	6,0
	5	9,5	9,2	6,7	5,7
	$\bar{x}$	9,66	10,0	8,2	5,06
$iso\text{-}C_{15}$	1	1,4	2,3	2,3	5,7
	2	1,4	2,3	2,4	3,9
	3	1,8	3,1	2,6	4,8
	4	1,6	2,3	2,7	2,5
	5	2,0	2,2	2,5	3,4
	$\bar{x}$	1,64	2,44	2,5	4,06

Fettsäure	Patient	freie Fettsäuren	Fettsäuren aus Triglyceriden	Fettsäuren aus Mono-Diglyc.	Fettsäuren aus Wachsestern
$n\text{-}C_{15}^{=}$	1	2,7	4,0	3,8	8,0
	2	2,7	4,0	3,7	7,9
	3	3,6	4,6	3,8	7,4
	4	2,6	3,3	3,2	7,0
	5	2,8	4,1	3,6	7,1
	$\bar{x}$	2,88	4,0	3,62	7,48
$n\text{-}C_{15}$	1	7,0	8,4	6,3	2,8
	2	9,7	10,2	7,9	2,8
	3	8,3	8,0	6,2	3,2
	4	6,9	7,1	5,7	3,1
	5	7,3	7,4	5,6	3,1
	$\bar{x}$	7,84	8,22	6,34	3,0
$iso\text{-}C_{16}$	1	0,9	0,4	1,1	2,4
	2	0,6	0,6	1,3	1,7
	3	0,5	0,9	0,9	0,9
	4	0,6	0,9	0,8	0,7
	5	0,9	1,1	1,4	0,7
	$\bar{x}$	0,7	0,78	1,1	1,28
$n\text{-}C_{16}^{=}$	1	7,2	14,3	13,2	35,7
	2	11,0	15,3	15,1	34,5
	3	11,6	15,3	13,8	38,5
	4	13,3	17,4	17,6	38,3
	5	11,0	16,5	13,3	38,7
	$\bar{x}$	10,82	15,76	14,6	37,14
$n\text{-}C_{16}$	1	33,8	28,6	26,6	7,9
	2	29,8	24,9	25,1	8,9
	3	34,0	28,1	26,9	11,8
	4	32,1	29,7	26,3	12,7
	5	31,0	30,0	25,7	12,3
	$\bar{x}$	32,14	28,26	26,12	10,72
$iso\text{-}C_{17}$	1	3,0	4,1	3,6	6,7
	2	3,4	3,8	4,3	6,5
	3	2,9	4,3	5,2	5,5
	4	4,1	4,2	4,0	4,7
	5	3,3	5,3	5,2	4,4
	$\bar{x}$	3,34	4,34	4,46	5,56

Fettsäure	Patient	freie Fettsäuren	Fettsäuren aus Triglyceriden	Fettsäuren aus Mono-Diglyc.	Fettsäuren aus Wachsestern
n-$C_{17}^{=}$	1	2,8	4,3	3,9	4,8
	2	4,2	4,8	4,6	5,4
	3	3,3	3,6	4,4	3,2
	4	4,0	3,3	3,6	3,6
	5	4,5	3,4	4,6	3,4
	$\bar{x}$	3,76	3,88	4,22	4,08
n-C_{17}	1	2,5	2,3	2,5	1,3
	2	3,3	2,7	2,4	1,5
	3	2,0	1,9	2,3	0,3
	4	2,3	1,5	2,1	0,4
	5	3,0	2,1	2,8	0,4
	$\bar{x}$	2,62	2,1	2,42	0,78
n-$C_{18}^{==}$	1	+	1,0	+	1,1
	2	+	0,9	+	1,4
	3	+	0,8	+	0,3
	4	+	0,7	+	0,5
	5	+	0,4	+	0,5
	$\bar{x}$		0,76		0,76
n-$C_{18}^{=}$	1	15,0	13,0	13,6	9,4
	2	13,2	12,0	10,8	10,0
	3	12,0	11,2	13,4	8,9
	4	14,9	11,8	11,7	9,1
	5	15,0	12,0	14,3	8,9
	$\bar{x}$	14,02	12,0	12,76	9,26
n-C_{18}	1	11,5	3,5	6,2	2,2
	2	8,3	4,4	5,3	2,1
	3	6,2	4,1	6,1	1,2
	4	6,9	3,3	6,5	1,4
	5	5,8	4,0	8,0	1,4
	$\bar{x}$	7,74	3,86	6,42	1,66
iso-C_{19}	1	+	+	+	+
	2	+	+	+	+
	3	+	+	+	+
	4	+	+	+	+
	5	+	+	+	+

Fettsäure	Patient	freie Fettsäuren	Fettsäuren aus Triglyceriden	Fettsäuren aus Mono-Diglyc.	Fettsäuren aus Wachsestern
$n\text{-}C_{19}^{=}$	1	+	+	+	+
	2	+	+	+	+
	3	+	+	+	+
	4	+	+	+	+
	5	+	+	+	+
$n\text{-}C_{19}$	1	+	+	+	+
	2	+	+	+	+
	3	+	+	+	+
	4	+	+	+	+
	5	+	+	+	+
$iso\text{-}C_{20}$	1	+	+	+	+
	2	+	+	+	+
	3	+	+	+	+
	4	+	+	+	+
	5	+	+	+	+
$n\text{-}C_{20}^{=}$	1	+	+	+	+
	2	+	+	+	+
	3	+	+	+	+
	4	+	+	+	+
	5	+	+	+	+
$n\text{-}C_{20}$	1	+	+	+	+
	2	+	+	+	+
	3	+	+	+	+
	4	+	+	+	+
	5	+	+	+	+

STATISTIK UND DISKUSSION DER ERGEBNISSE

I. Statistik

Die Analysenergebnisse der Normal- und Aknehautfette wurden statistisch[+)] ausgewertet, d.h. einmal wurden die Gesamtbestandteile der Normal- und Aknehautfette miteinander verglichen, zum anderen wurden die einzelnen Fettsäuren der verschiedenen Fettsäurefraktionen (freie Fettsäuren, Fettsäuren der Triglyceride, Mono-Diglyceride und Wachsester) innerhalb der fünf Normal- und der fünf Aknehautfette untersucht und gegenübergestellt. Im folgenden wird kurz die Methodik der durchgeführten Berechnungen wiedergegeben:

1.) Prüfung des Mittelwertes einer Stichprobe.

Voraussetzungen: Normalverteilung, Werte unabhängig.

Prüfgröße: $t = \frac{\bar{x} - \hat{\mu}}{s_{\bar{x}}}$ (t-verteilt mit N-1 Freiheitsgraden)

Hypothese: Der wahre Mittelwert μ sei gleich einem angenommenen $\hat{\mu}$ (Schätzwert für den wahren Mittelwert ist $\bar{x}$, Schätzwert für dessen Varianz $s^2_{\bar{x}}$). Signifikanzniveau $2\alpha = 0,01$.

2.) Dreifache Varianzanalyse.

Faktoren: Fettsäurefraktion, Diagnose, Patient.

Voraussetzungen: Normalverteilung, Stichproben unabhängig, Homoskedastizität. Die F-Tests (Signifikanzniveau $\alpha = 0,01$) sagen aus, ob der durch einen speziellen F-Test geprüfte Faktor bzw. eine Faktorenkombination von Bedeutung ist oder nicht. Einzelunterschiede können

---

[+)] Fr. Dr. K. Böhme, Institut für medizinische Biometrie der Universität Tübingen, sei für die Durchführung der Statistik herzlich gedankt.

dann mit Hilfe eines simultanen Mittelwertvergleichs ermittelt werden (Scheffé-Test). Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$.

3.) Zweifache Varianzanalyse.

Faktoren: Fettsäurefraktion, Patient.

Voraussetzungen: siehe 2.). F-Tests: Signifikanzniveau $\alpha = 0,01$. Sie wird angewendet, wenn die dreifache Varianzanalyse eine Wechselwirkung zwischen den Faktoren Diagnose (Akne, normal) und den Fettsäurefraktionen ergeben hat, weil dann der globale Scheffé-Test bedeutungslos ist, da in den Gruppen andere Unterschiede bestehen können. Einzelunterschiede werden wieder mit dem Scheffé-Test ermittelt.

4.) Mittelwertvergleich unabhängiger Stichproben, t-Test.

Voraussetzung ist die Homoskedastizität (Gleichheit der Varianzen) der beiden Stichproben, die mittels F-Test geprüft wird. Die t-Tests werden ebenfalls gerechnet, wenn zwischen den Faktoren Diagnose und Fettsäurefraktion eine Wechselwirkung signifikant bzw. mindestens auffällig war (auffällig entspricht einem p kleiner als 0,20). Signifikanzniveau für den t-Test: $2\alpha = 0,01$.

Die Voraussetzung der Homoskedastizität (Varianzengleichheit) erschien im allgemeinen annehmbar.

A. Vergleich der Gesamtbestandteile der Hautfette von Normalpersonen und Aknepatienten nach der Methode 4.)

Ergebnisse der Tests (FG = 8), die Werte sind auf die Einwaage bezogen (%):

(+)	wasserlösliche Bestandteile	$t = -3,293$	$0,02 > p > 0,01$	schwach signifikant[+)]
(-)	petrolätherunlösl. Bestandteile	$t = 1,706$	$0,20 > p > 0,10$	nicht signifikant
(-)	freie Fettsäuren	$t = 5,414$	$p < 0,001$	hoch signifikant
(+)	Kohlenwasserstoffe	$t = -6,737$	$p < 0,001$	hoch signifikant
(+)	Squalen	$t = -3,288$	$0,02 > p > 0,01$	schwach signifikant
(+)	Triglyceride	$t = -5,817$	$p < 0,001$	hoch signifikant
(-)	Mono-Diglyceride	$t = 2,263$	$0,10 > p > 0,05$	auffällig
	Fettalkohole	$t = 0$	$p = 1,0$	nicht signifikant
(-)	Wachsester	$t = 2,711$	$0,05 > p > 0,025$	schwach signifikant
	Cholesterinester	$t = -0,134$	$0,90 > p > 0,80$	nicht signifikant

(+) bedeutet: bei Akne gegenüber normal erhöht

(-) bedeutet: bei Akne gegenüber normal erniedrigt

B. Statistische Auswertung der einzelnen Fettsäuren der verschiedenen Fettsäurefraktionen der Normal- und Aknehautfette

Aus dem großen Zahlenmaterial sollen hier der Übersichtlichkeit wegen nur die wesentlichsten Merkmale herausgegriffen und der t-Test erwähnt werden, aber auch nur dann, wenn sich innerhalb der einzelnen Fettsäuren der verschiedenen Fettsäurefraktionen der Normal- und Aknehautfette auffallende Unterschiede ergeben.

[+)] p = Überschreitungswahrscheinlichkeit, die Signifikanz wird wie folgt eingeteilt:

$p > 0,10$	nicht signifikant	$0,01 > 0,001$	signifikant
$0,10 > p > 0,05$	auffällig	$p < 0,001$	hoch signifikant
$0,05 > p > 0,01$	schwach signifikant		

Die Fettsäurefraktionen sind folgendermaßen aufgeteilt:

I = freie Fettsäuren

II = Fettsäuren aus Triglyceriden

III = Fettsäuren aus Mono-Diglyceriden

IV = Fettsäuren aus Wachsestern

Aknehautfett

	Fraktion	Fettsäure	Überschreitungswahrscheinlichkeit	Signifikanz
(+)	III	n-$C_{12}^{=}$	0,005 > p > 0,001	signifikant
(+)	III	n-C_{12}	0,02 > p > 0,01	schwach signifikant
( )	IV	n-C_{12}	0,10 > p > 0,05	auffällig
(+)	II	n-C_{14}	p < 0,001	hoch signifikant
(+)	III	n-C_{14}	0,10 > p > 0,05	auffällig
(+)	II	n-C_{15}	0,10 > p > 0,05	auffällig
(+)	II	n-C_{16}	0,02 > p > 0,01	schwach signifikant

(+) bedeutet: bei Akne gegenüber normal erhöht

Normalhautfett

	Fraktion	Fettsäure	Überschreitungswahrscheinlichkeit	Signifikanz
(+)	II	n-$C_{17}^{=}$	0,025 > p > 0,02	schwach signifikant
(+)	I	n-$C_{18}^{==}$	p < 0,001	hoch signifikant
(+)	II	n-$C_{18}^{==}$	0,05 > p > 0,025	signifikant
(+)	III	n-$C_{18}^{==}$	0,01 > p > 0,005	signifikant
(+)	II	n-$C_{18}^{=}$	p < 0,001	hoch signifikant
(+)	III	n-$C_{18}^{=}$	0,10 > p > 0,05	auffällig
(+)	III	n-C_{18}	0,10 > p > 0,05	auffällig
(+)	IV	n-C_{18}	0,02 > p > 0,01	schwach signifikant

(+) bedeutet: bei Normalhautfett gegenüber Aknehautfett erhöht

II. Diskussion

Bei den Untersuchungen wurden sowohl im Normal- als auch im Akne-Hautfett die in Tabelle 10 wiedergegebenen Bestandteile qualitativ und quantitativ erfaßt, wobei die Fettsäuren der freien Fettsäuren, Triglyceride, Mono-Diglyceride und Wachsester noch im einzelnen bestimmt wurden.

Tabelle 10

Mittlerer prozentualer Anteil der Bestandteile der Normal- und Akne-Hautfette.

Bestandteile	Normalhautfett	Aknehautfett
wasserlösl. Bestandteile	1,9	3,4
petrolätherunl. "	5,8	4,8
freie Fettsäuren	24,5	16,0
Kohlenwasserstoffe	2,0	3,8
Squalen	9,7	12,6
Triglyceride	22,3	29,5
Mono-Diglyceride	10,8	9,4
Fettalkohole	0,5	0,5
Wachsester	19,7	17,2
Cholesterinester	2,3	2,3

Die Statistik zeigt deutliche Unterschiede (hoch signifikant) bei den freien Fettsäuren, Kohlenwasserstoffen und Triglyceriden, weniger deutliche (schwach signifikant) bei den wasserlöslichen Bestandteilen, Squalen und Wachsestern. Besonders bemerkenswert ist dabei die Wechselbeziehung der freien Fettsäuren mit den Triglyceriden der Normal- und Akne-Hautfette.

Unsere Resultate stehen qualitativ in Übereinstimmung mit den Angaben von WHEATLEY[7)], BEY[12)], HAAHTI[19)], NICOLAIDES[20)] und einigen weiteren Autoren[13-18)], die sich nur mit Teilanalysen von Hautfetten beschäftigten. Ein quantitativer Vergleich mit den Ergebnissen anderer Autoren ist dadurch erschwert, daß die prozentualen Angaben durch

Einbeziehung unterschiedlicher Komponenten stark variieren. Lediglich die Angaben von BEY[12] können bedingt als Vergleich herangezogen werden - es sind nur Näherungswerte angegeben -, da er das Hautfett in dieselben Komponenten zerlegte; diese Werte decken sich in etwa mit unseren Befunden. Auch er fand in zwei Fällen eine Beziehung zwischen freien Fettsäuren und Triglyceriden und stellt einen direkten Zusammenhang dieser Wechselwirkung einerseits und die Esterasenaktivität bzw. Schweißsekretion auf der anderen Seite zur Diskussion.
Die Mengen der freien Fettsäuren gegenüber den gebundenen in Analysen von Hautoberflächenfetten sind erheblich größer als in der Untersuchung von PETER[21] an isoliertem Talgdrüsenmaterial gefunden wurde.

Als einzelne Fettsäuren der untersuchten Fettsäurederivate konnten gerade- und ungeradzahlige, gesättigte und ungesättigte, unverzweigte und iso-Fettsäuren innerhalb des Bereiches von C_{10}-C_{20} gefunden werden.

In der Gruppe der freien Fettsäuren liegen die Maxima bei n-C_{14}, n-$C_{16}^{=}$, n-C_{16} und n-$C_{18}^{=}$, wobei die Palmitinsäure mit etwa 33% am stärksten vertreten ist. Unsere Ergebnisse stimmen mit denen anderer Autoren überein, daß Maxima bei C_{16} und C_{18} liegen. Das relativ starke Vorkommen von ungesättigten C_{16} - und C_{18} - Fettsäuren, auf das schon STÜTTGEN[15], RUST[16], BEY[12] und PETER [21] hinwiesen, wird durch unsere Ergebnisse bestätigt.

Das gleiche gilt für die in Triglyceriden gebundenen Fettsäuren; ähnliche Resultate erhielten auch noch NICOLAIDES[20] und WHEATLEY[23].

Über die Verteilung der Fettsäuren in der Gruppe der Mono-Diglyceride kann als Vergleich nur die Arbeit von BEY[12] herangezogen werden, da andere Autoren die Mono-Diglyceride zusammen mit den Triglyceriden untersucht und diese nicht voneinander getrennt haben. Beide Arbeiten stimmen gut überein, das Maximum liegt auch hier bei der Palmitinsäure mit etwa 25%.

In der Gruppe der Wachsester verglichen NICOLAIDES und FOSTER[4] die Molekulargewichte und Jodzahlen der Fettsäuren von Wachsestern mit denen

von freien und in Triglyceriden gebundenen Fettsäuren. Aus den hohen Jodzahlen schlossen sie, daß der Anteil an ungesättigten Fettsäuren bei den Wachsestern etwa doppelt so hoch liegt wie bei den freien Fettsäuren und Triglyceriden. Diesen Befund bestätigten später BOUGHTON[24], HAAHTI[19], BEY[12] und PETER[21]. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen liegt nämlich der prozentuale Anteil der Palmitinsäure mit etwa 10% niedriger als bei den vorher erwähnten Gruppen, dafür weist aber die Palmitoleinsäure (n-$C_{16}^{=}$) einen Gehalt von etwa 37% auf.

Dieser Vergleich unserer Ergebnisse mit denen anderer Autoren zeigt im wesentlichen gute Übereinstimmung.

Schließlich soll noch auf die Unterschiede innerhalb der einzelnen Fettsäuren der Normal- und Akne-Hautfette, wie sie aus der Statistik (S. 43) deutlich wurden, eingegangen werden.

Im Normal- und Akne-Hautfett sind die gleichen Fettsäuren enthalten, es bestehen aber quantitativ einige Unterschiede. So ist der prozentuale Anteil langkettiger Fettsäuren - besonders in der Gruppe der Triglyceride und Mono-Diglyceride - im Normalhautfett größer als im Aknehautfett, und umgekehrt ist der prozentuale Anteil kurzkettiger Fettsäuren - besonders der ungesättigten $C_{12}^{=}$ Fettsäuren aus den Mono-Diglyceriden - im Aknehautfett größer.

Zusammenfassend können als bemerkenswerteste Unterschiede festgestellt werden: die höheren Anteile der Kohlenwasserstoffe und des Squalen im Aknehautfett und die Wechselbeziehung der freien Fettsäuren und der Triglyceride; der größere Anteil langkettiger Fettsäuren im Normalhautfett und der größere Anteil kurzkettiger Fettsäuren im Aknehautfett.

Diese Resultate beweisen einen quantitativ verschiedenen Aufbau der Aknehautfette gegenüber den Normalhautfetten.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

Es wird über die Bestimmung des Hautoberflächenfettes von gesunden und an Akne erkrankten Personen berichtet. Anhand der statistischen Auswertung werden die Ergebnisse diskutiert.

Die zu untersuchenden Hautfette wurden jeweils von Stirn und Rücken männlicher Versuchspersonen (17 - 31 Jahre) gesammelt. Durch Kombination von Säulen-, Dünnschicht- und Gaschromatographie wurden wasserlösliche und petrolätherunlösliche Bestandteile, freie Fettsäuren, Kohlenwasserstoffe, Squalen, Triglyceride, Mono-Diglyceride, Fettalkohole, Wachs- und Cholesterinester nachgewiesen; die einzelnen Fettsäuren der freien Fettsäuren, Triglyceride, Mono-Diglyceride und Wachsester wurden identifiziert und quantitativ bestimmt.

Es wurden gerad- und ungeradzählige, gesättigte und ungesättigte, unverzweigte und iso-Fettsäuren von C_{10} - C_{20} gefunden.

Die Hauptanteile liegen bei den C_{16}- und C_{18}-Fettsäuren. In der Gruppe der freien Fettsäuren, Triglyceride und Mono-Diglyceride liegt das Maximum bei der Palmitinsäure, bei den Wachsestern dagegen bei der Palmitoleinsäure.

Es konnte ein quantitativ verschiedener Aufbau der Akne- gegenüber den Normalhautfetten bewiesen werden. Kohlenwasserstoffe, Squalen und Triglyceride sind im Aknehautfett mehr, freie Fettsäuren dagegen weniger enthalten. Des weiteren stieg der prozentuale Anteil der kurzkettigen Fettsäuren an.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Geräte

für Säulenchromatographie:

Es wurde eine Säule von 50 cm Länge, 15 mm Innendurchmesser mit unten eingeschmolzener Glasfritte 1 GO, Ablaufhahn und Ablaufspitze, oberem Hülsenschliff NS 14,5 zur Aufnahme eines Tropftrichters und eines Calciumchloridrohres verwendet. Säulenfüllungen und Elutionsmittel sind bereits im Text beschrieben (S. 10 u. Abb. 1).
Bei PÄ wurde immer die Siedefraktion 50-70° verwendet.

für Dünnschichtchromatographie:

Es wurde mit der Grundausrüstung der Fa. Desaga, Heidelberg, mit Platten 20 x 20 cm gearbeitet. Zur Bereitung von je fünf Platten wurden 25,0 g "Kieselgel G MERCK" und 50 ml dest. Wasser verwendet. Vor dem Auftragen wurde 30 Min. bei 110° aktiviert. Die Laufstrecke betrug 12 cm. Verwendung fanden die Fließmittel I + II:

I:	PÄ / Äther / Eisessig	90 + 10 + 1	(Vol.)
II:	PÄ / Benzol	4 + 7	(Vol.)

Zur Detektion diente Bromthymolblaulösung (40 mg in 100 ml 0,01 n NaOH gelöst) mit anschließendem Trocknen (10 Min. bei 110°).

für Gaschromatographie:

Die gc Untersuchungen wurden in einem Gerät der Fa. Varian, Modell 1525 B und mechanischem DISC-Integrator, Modell 201-B, ausgeführt. Näheres im Textteil.

A. ZUR DURCHFÜHRUNG DES ANALYSENGANGES MIT MODELLGEMISCHEN AUS REFERENZSUBSTANZEN

Tabelle 11

Modellgemisch von Referenzsubstanzen

Substanzen	Einwaage (mg)
Harnstoff	5
Cholesterin	10
Palmitinsäure	30
Octadecan	5
Squalen	15
Palmitinsäurepalmitylester	40
Cholesteryl-stearat + -palmitat	5
Tri-stearat + -myristat	50
Mono- und Diglycerid der Ölsäure	20
Cetylalkohol	5

I. Abtrennung der wasserlöslichen und petrolätherunlöslichen Bestandteile und der freien Fettsäuren

Das Modellgemisch wurde in 100 ml PÄ aufgenommen, der wasserlösliche Bestandteil (Harnstoff) durch Ausschütteln mit 2mal je 20 ml dest. Wasser entfernt, das Wasser im Vakuum abdestilliert, der Rückstand getrocknet und gewogen.

Der petrolätherunlösliche Bestandteil (Cholesterin) wurde abfiltriert, das Filtrierpapier mit dem Rückstand im Vakuumexsikkator getrocknet und danach gewogen.

Aus der nun erhaltenen PÄ-phase (I) ließ sich die freie Fettsäure (Palmitinsäure) durch 3maliges Ausschütteln mit je 20 ml 0,05 n NaOH in 50proz. Äthanol abtrennen. Die vereinigten alkalischen Auszüge wurden mit 50 ml PÄ ausgeschüttelt und der PÄ der PÄ-phase (I) hinzugefügt. Die alkalische Lösung wurde mit n-H_2SO_4 angesäuert, mit 3mal je 20 ml PÄ extrahiert,

und danach wurden die vereinigten PÄ-auszüge zur Entfernung der Schwefelsäure 3mal mit je 10 ml dest. Wasser ausgewaschen. Nach 3stdg. Trocknen mit Na_2SO_4 wurde abfiltriert, der PÄ im rotierenden Verdampfer abdestilliert, der Rückstand im Exsikkator getrocknet und dann gewogen.
Alle drei Substanzen konnten quantitativ abgetrennt und bestimmt werden.
Die in der PÄ-phase (I) enthaltenen restlichen Bestandteile wurden nach 3stdg. Trocknung mit Na_2SO_4 am rotierenden Verdampfer bis auf wenige ml eingeengt, mit einer Pipette unter Nachspülen mit PÄ quantitativ auf die vorbereitete Säule gebracht und der SC unterworfen.

II. Sc Trennung des Modellgemisches mit anschließender dc Prüfung

Tabelle 12

Sc Trennung der Referenzsubstanzen und die nach erfolgter Trennung ermittelte Menge der einzelnen Bestandteile.

Eluens	Menge (ml)	eluierte Substanzen	gef. Menge (mg)
I PÄ	150	Octadecan	4,9
II 20% Benzol in PÄ	200	Squalen	14,9
III 70% Benzol in PÄ	200	Palmitinsäurepalmitylester, Cholesteryl-stearat u. -palmitat	44,8
IV 40% Äther in PÄ	150	Tri-stearat u. -myristat	58,5
V Äthanol	150	Mono-Diglycerid der Ölsäure, Cetylalkohol	16,2
IIIa 3% Äther in PÄ	150	Palmitinsäurepalmitylester	39,7
IIIb Äthanol	100	Cholesteryl-stearat u. -palmitat	4,8
Va Benzol	100	Cetylalkohol	3,5
Vb Äthanol	100	Mono-Diglycerid der Ölsäure	12,5

Die Fraktionen I-V und IIIa-b wurden auf einer 20 g Kieselgel-Säule, die Fraktionen Va-b auf einer mit 20 g Aluminiumoxid neutral (Akt.-St. IV) beschickten Säule getrennt.

Die dc Untersuchung der gesammelten Fraktionen zeigte, wie auch aus den gefundenen Mengen der Bestandteile in Tab. 12 hervorgeht, keine saubere Trennung des Cetylalkohols und der Triglyceride von den Mono-Diglyceriden. Mit dem Eluens IV wurde schon ein Teil der Mono-Diglyceride und des Cetylalkohols miteluiert.

Eine saubere sc Trennung wurde durch Verringerung der Elutionsmittelmengen erreicht. Nachfolgende Tab. 13 gibt die erneute sc Trennung desselben Gemisches mit veränderten Lösungsmittelmengen wieder.

Tabelle 13

Sc Trennung der Referenzsubstanzen und die nach der Trennung wiedergefundene Menge der Einzelbestandteile.

Eluens	Menge (ml)	eluierte Substanzen	gef. Menge (mg)
I	100	Octadecan	4,9
II	100	Squalen	14,9
III	150	Palmitinsäurepalmitylester, Cholesterylstearat u. palmitat	44,8
IV	100	Tri-stearat u. -myristat	49,7
V	120	Mono-Diglycerid der Ölsäure, Cetylalkohol	24,8
IIIa	150	Palmitinsäurepalmitylester	39,8
IIIb	100	Cholesteryl-stearat u. -palmitat	4,8
Va	100	Cetylalkohol	4,9
Vb	100	Mono-Diglyceride der Ölsäure	19,8

Die in Schnappdeckelgläschen zu je 20 ml gesammelten Fraktionen wurden dc untersucht, dazu wurde jeder Fraktion etwa 0,1 ml entnommen und auf die Platte aufgetragen. Abb. 7 zeigt, daß die sc Trennung des Modellgemisches gelungen ist.

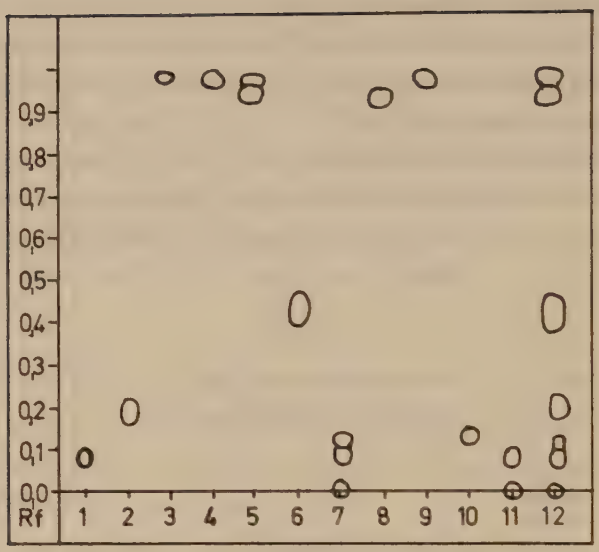


Abb. 7 Schematisches DC der gesammelten Fraktionen des Modellgemisches (Fließmittel I)

1. Cholesterin
2. Palmitinsäure
3. Octadecan
4. Squalen
5. Palmitinsäurepalmitylester, Cholesteryl-stearat u. -palmitat
6. Tri-stearat u. -myristat
7. Mono-Diglycerid der Ölsäure, Cetylalkohol
8. Palmitinsäurepalmitylester
9. Cholesteryl-stearat u. palmitat
10. Cetylalkohol
11. Mono-Diglycerid der Ölsäure
12. Hautfett

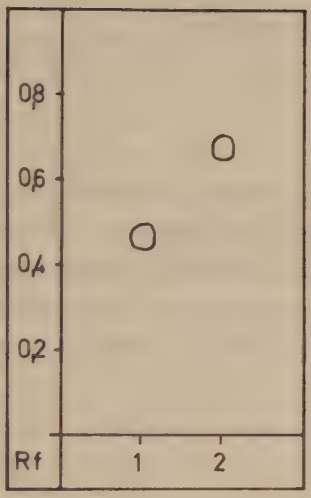


Abb. 8

Schematisches DC der gesammelten Fraktionen des Modellgemisches (Fließmittel II)

1. Palmitinsäurepalmitylester
2. Cholesteryl-stearat u. -palmitat

Nach der dc Prüfung wurden die gesammelten Fraktionen der einzelnen Bestandteile vereinigt, die Lösungsmittel am rotierenden Verdampfer vorsichtig abdestilliert und die zurückbleibenden Substanzen nach vollständiger Trocknung im Vakuumexsikkator gewogen. Die wiedergefundenen Mengen der einzelnen Bestandteile sind in Tab. 13 angegeben.

III. Gc Trennung

1. Probenvorbereitung

Die aus den freien Fettsäuren, Triglyceriden, Mono-Diglyceriden und Wachsestern gewonnenen Fettsäuremethylester wurden in einem 5 ml Schliffkölbchen in der 10fachen Menge Äther gelöst. Bei der Entnahme von etwa 3-4 µl, die zur gc Trennung benötigt wurden, war auf gute Homogenität der Probe zu achten, da bei den vorhandenen geringen Substanzmengen leicht eine Entmischung eintreten konnte, die zu groben Fehlern

bei der quantitativen Auswertung führen könnte. Deshalb wurden die Proben unmittelbar vor der Entnahme sorgfältig umgeschüttelt.

2. Identifizierung

Nachdem mit Hilfe des Diagrammes in Abb. 4 erste Anhaltspunkte für die Fettsäurenverteilung der untersuchten Proben erhalten waren, wurden den einzelnen Proben für die in Frage kommenden Fettsäuren verschiedene authentische Fettsäuremethylester in einer Menge von 1 µl zugesetzt und neuerlich ein GC angefertigt. In Tab. 14 stehen die als Vergleichssubstanzen verwendeten Fettsäuremethylester.

Tabelle 14

Als Vergleichssubstanzen dienende Fettsäuremethylester

Fettsäure		Fettsäure	
n-C_{10}	Caprinsäure	iso-C_{16}	3-Methylpentadecansäure
n-C_{11}=	10-Undecensäure	n-C_{16}=	9-Hexadecensäure
n-C_{11}	Undecansäure	n-C_{16}	Palmitinsäure
n-C_{12}=	9-Dodecensäure	n-C_{17}	Heptadecansäure
n-C_{12}	Laurinsäure	n-C_{18}=	Ölsäure
n-C_{13}	Tridecansäure	n-C_{18}==	Linolsäure
n-C_{14}=	9-Tetradecensäure	n-C_{18}	Stearinsäure
n-C_{14}	Myristinsäure	n-C_{19}	Nonadecansäure
iso-C_{15}	3-Methylmyristinsäure	n-C_{20}	Arachinsäure
n-C_{15}=	9-Pentadecensäure		
n-C_{15}	Pentadecansäure		

Traten im Vergleichschromatogramm keine neuen Peaks auf, sondern zeigten nur die bereits vorhandenen Banden eine Flächenvergrößerung, so konnten die einzelnen Peaks den betreffenden Fettsäuren zugeordnet werden.

3. Quantitative Auswertung der GC

Da sämtliche quantitativen Bestimmungen aus den GC der einzelnen Fettsäurederivaten der fünf Normalhautfett- und der fünf Aknehautfett-Analysen nach demselben Prinzip verlaufen, sei hier nur die Berechnung der Fettsäuren aus den Triglyceriden der 3. Normalhautfettanalyse als Beispiel herausgegriffen.

Die durch den Integrator mitgeschriebenen Peakflächen der einzelnen Fettsäuremethylester wurden direkt aus dem GC abgelesen und mit den dazugehörigen Eichfaktoren multipliziert. Durch Division der so erhaltenen korrigierten Flächenwerte der einzelnen Fettsäuren aus ihrer Gesamtsumme wurde nun der Prozentgehalt der einzelnen Fettsäuren ermittelt. (Alle Prozentwerte wurden mittels Rechenschieber berechnet.) Tab. 15 gibt diese Berechnung wieder, der darin angeführte Rest von 3,9% setzt sich aus der Summe der Flächenwerte der im GC nur in Spuren bis 0,5% vorhandenen Fettsäuremethylester, multipliziert mit dem Mittelwert der Eichfaktoren, zusammen.

Tabelle 15

Quantitative Auswertung des GC der Fettsäuremethylester aus den Triglyceriden der 3. Normalhautfettanalyse

Fettsäure	Flächenwert	x Eichfaktor	korr. Flächenwert	Gew.-%
n-C_{12}	3	1,371	4,1	0,8
n-C_{14}=	7	1,333	9,3	1,6
n-C_{14}	28	1,344	37,6	6,5
iso-C_{15}	11	1,333	14,6	2,5
n-C_{15}=	16	1,323	21,1	3,7
n-C_{15}	26	1,333	34,6	6,0
iso-C_{16}	6	1,323	7,9	1,4
n-C_{16}=	69	1,313	90,6	15,8
n-C_{16}	96	1,323	127,0	22,1
iso-C_{17}	21	1,314	27,6	4,8
n-C_{17}=	22	1,305	28,7	5,0
n-C_{17}	13	1,314	17,1	3,0
n-C_{18}==	7	1,289	9,0	1,5
n-C_{18}=	69	1,298	89,5	15,5
n-C_{18}	26	1,307	34,0	5,9
Rest	17	1,313	22,3	3,9
			575,0	

Lebenslauf

Am 24. April 1940 wurde ich, Gerhard Brunn, als Sohn des Dipl.-Ing. Hellmuth Brunn und seiner Ehefrau Erika, geb. Krieger in Lahr geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule trat ich 1950 in das Scheffel-Gymnasium in Lahr ein, an dem ich im März 1959 die Reifeprüfung ablegte. Im April 1953 verstarb mein Vater.

Von 1959 bis 1961 war ich Apothekerpraktikant in der Lotzbeck-Apotheke in Lahr bei Herrn Apotheker H. von der Linde. Im Frühjahr 1961 legte ich in Freiburg die Pharmazeutische Vorprüfung ab und begann unmittelbar danach mit dem Studium der Pharmazie an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen, das ich im Herbst 1965 mit dem Pharmazeutischen Staatsexamen abschloß.

Nach einer 6monatigen Tätigkeit als Kandidat der Pharmazie in der Lotzbeck-Apotheke in Lahr begann ich im Mai 1966 am Pharmazeutisch-chemischen Institut der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen unter der Anleitung der Herren Professoren Dr. E. Graf und Dr. H. Tronnier (Universitäts-Hautklinik) mit der Anfertigung der vorliegenden Dissertation, die ich im Mai 1971 abschloß. Von Mai 1966 an war ich als Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle an der Universitäts-Hautklinik, seit dem WS 68/69 als wissenschaftliche Hilfskraft am Pharmazeutisch-chemischen Institut der Universität Tübingen beschäftigt.

Ich bin seit 1970 mit der Apothekerin Dagmar Löffler verheiratet und habe einen Sohn.

Meine akademischen Lehrer außer den Herren Professoren Dr. E. Graf und Dr. H. Tronnier waren die Herren Professoren und Dozenten:

H. Auterhoff, K.G. Bergner, W. Cyran, H. Feltkamp, W. Hückel, K. Hummel, H. Kaiser, H. Möhrle (Pharmazie); M. Hanack, E. Müller, W. Rüdorff (Chemie); E. Bünning, A. Grahle, K. Mägdefrau, H. Metzner, B. Schwemmle, W. Zimmermann (Botanik); H. Ühleke (Pharmakologie); R.E. Bader (Hygiene); H. Krüger (Physik).